

Université de Montréal

EFFETS DE L'EXERCICE SUR LE DÉVELOPPEMENT FŒTAL CHEZ LA SOURIS LORS  
DE DOULEUR NEUROPATHIQUE CHEZ LA FEMELLE GESTANTE

Par

Madeleine Parent-Vachon

Département de biomédecine  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès Sciences* (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires, option biomédecine

Juillet 2019

© Madeleine Parent-Vachon, 2019

Ce mémoire intitulé

EFFETS DE L'EXERCICE SUR LE DÉVELOPPEMENT FŒTAL CHEZ LA SOURIS LORS  
DE DOULEUR NEUROPATHIQUE CHEZ LA FEMELLE GESTANTE

Présenté par

Madeleine Parent-Vachon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Francis Beaudry  
Président-rapporteur

Pascal Vachon  
Directeur de recherche

Christopher Price  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

La douleur peut avoir un impact négatif pendant la grossesse des femmes en affectant les plans physiologiques et psychologiques. Les femmes enceintes craignent utiliser de la médication analgésique, qui peut mener à des effets néfastes ou tératogènes sur le fœtus en développement. Pour ce mémoire, nous avons évalué le développement des souriceaux de mères ayant une douleur neuropathique ; et nous avons évalué si l'exercice pouvait diminuer les effets négatifs attendus sur les souriceaux ainsi que de diminuer la sensibilité à la douleur des mères. Trente-deux femelles ont été assignées aléatoirement à quatre groupes (8 femelles/groupe) : Chirurgie *Sham* ou *Spared Nerve Injury* (SNI) avec environnements standard (ES) ou enrichi (EE). La sensibilité mécanique des mères a été évaluée avec les filaments de Von Frey et la performance de l'activité physique avec des roues d'exercice informatisées. Les souriceaux ont été pesés et mesurés à la naissance. Au troisième jour postpartum, ils ont été évalués pour la géotaxie négative, le redressement, la préhension des membres supérieurs, le réflexe des points cardinaux (*rooting*) et le rampement, et le rampement a été également évalué au sixième jour postpartum. Suite à l'euthanasie, les cerveaux (cortex frontal) des mères ont été analysés pour des neuropeptides sélectionnés. Suite à l'exposition à l'activité, seulement les mères SNI-ES demeuraient neuropathiques et les niveaux d'exercice ont été similaires dans les groupes exposés. Certains neuropeptides cérébraux (enképhalines, endorphines et ocytocine) dans le tissu cérébral des femelles SNI ont montré une différence significative avec exercice. Le nombre de souriceaux était significativement plus petit dans le groupe SNI ES. Le nombre de décès à la naissance était plus important dans le groupe SNI ES, cependant les tests comportementaux étaient similaires dans tous les groupes (excepté pour le test de redressement). Sommairement, l'exercice peut réduire la douleur neuropathique chez les

femelles CD-1. La douleur neuropathique n'a pas d'effet sur le neurodéveloppement des souriceaux, mais semble avoir un effet sur le nombre de la portée et sur la mortalité.

*Mots clés* : Douleur neuropathique, enrichissement de l'environnement, Spared Nerve

Injury, peptides de la douleur, exercice, souris

## ABSTRACT

Pain can negatively impact a pregnancy in women on physiological and psychological levels. Pregnant women with pain are fearful of using pain medication, which can lead to adverse outcomes. In this study we evaluated the development of mice pups from mothers with neuropathic pain; and evaluated if exercise could diminish the negative effects on newborns as well as lowering pain sensitivity in mothers. Thirty-two females were randomly assigned to four groups (8 mice/group): Sham surgery or Spare Nerve Injury (SNI) with standard (SE) or enriched (EE) environments. Mothers were evaluated for mechanical sensitivity with Von Frey filaments and exercise performance with computerized running wheels. Pups were weighted and measured in length at birth. Three days postpartum, they were evaluated for negative geotaxis, righting, forelimb grasping, rooting and crawling, and crawling at six days postpartum. Following euthanasia, mothers' brains (frontal cortex) were analyzed for selected neuropeptides. Following exercise exposure, only SNI SE females remained neuropathic and exercise levels were similar between exposed groups. Some brain neuropeptides (endorphins, enkephalins and oxytocin) in brain tissue from SNI females showed significant difference with pain and returned to normal levels with exercise. A number of pups were significantly smaller only in SNI SE group. The number of deaths at birth was more important in SNI SE only, however, behavior tests were similar (except righting) across groups. In summary, exercise can reduce neuropathic pain in pregnant CD-1 female mice, however, neuropathic pain doesn't impact the motor neurodevelopment of mice pups but appears to affect litter size and neonatal mortality.

*Key words:* Neuropathic pain, gestation, environmental enrichment, spared nerve injury, exercise, pain peptides, mice

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	6
Liste des tableaux.....	10
Liste des figures.....	11
Liste des sigles et des abréviations.....	15
Dédicace.....	17
Remerciements.....	18
Introduction.....	19

### **RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>20</b>
<b>1. LA DOULEUR CHRONIQUE.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1. Fonctionnement de la nociception .....</b>	<b>22</b>
<u>1.1.1 Étapes de la nociception .....</u>	<u>22</u>
<u>1.1.2 Fibres nociceptives.....</u>	<u>22</u>
<u>1.1.3 Transmission de la douleur.....</u>	<u>23</u>
<u>1.1.4 Modulation de la douleur.....</u>	<u>26</u>
<b>1.2 Douleur chronique neuropathique .....</b>	<b>27</b>
<u>1.2.1 Mécanismes de douleur neuropathique .....</u>	<u>27</u>
<u>1.2.2 Neuropeptides de douleur.....</u>	<u>29</u>
<u>1.2.2.1 Les tachykinines.....</u>	<u>30</u>

1.2.2.2 Le peptide relié au gène de la calcitonine.....	31
1.2.2.3 Les dynorphines .....	31
1.2.2.4 L'ocytocine .....	32
1.2.2.5 Les endorphines et les enképhalines.....	33
1.2.3 Traitement pharmacologique lors d'une grossesse .....	34
<b>1.3 Évaluation de la douleur neuropathique.....</b>	<b>35</b>
1.3.1 Modèles animaux .....	35
1.3.2 Chirurgie au niveau du nerf sciatique.....	36
1.3.3 Test pour évaluation de la douleur neuropathique .....	38
<b>2. ENRICHISSEMENT DE L'ENVIRONNEMENT.....</b>	<b>40</b>
2.1 Définition de l'enrichissement de l'environnement .....	40
2.2. L'enrichissement de l'environnement et douleur neuropathique .....	43
2.3 Roues d'exercice informatisées.....	44
3.1 Modèles animaux .....	45
3.2 Étapes de la reproduction chez la souris .....	46
3.3 Placenta .....	48
3.3.1 Rôles du placenta .....	52
3.3.2 Barrière fœto-placentaire.....	53
3.3.3 Cytokines et système endocrinien.....	54
<b>4. LES SOURICEAUX.....</b>	<b>56</b>
4.1 Développement normal des souriceaux .....	56

<b>4.2 Tests post-naissance .....</b>	<b>58</b>
4.2.1 Géotaxie négative.....	58
4.2.2 Recouvrement .....	59
4.2.3 Rooting .....	59
4.2.4 Préhension.....	59
4.2.5 Rampement .....	59
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>62</b>
<b>OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....</b>	<b>63</b>

## ARTICLE

<b>Abstract.....</b>	<b>65</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>66</b>
<b>Methods.....</b>	<b>68</b>
Animals and Environmental Conditions.....	68
Research Protocol.....	69
Evaluations of Female Mice.....	70
Pup evaluations.....	71
Evaluation of Brain Peptides.....	72
Statistical Analyses.....	74
<b>Results.....</b>	<b>75</b>
Mechanical sensitivity, running performance of mothers and brain peptides.....	75
Gestation Duration and Assessments of Pups at Birth and on Days 3 and 6.....	75



<b>Discussion.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>82</b>

## DISCUSSION ET CONCLUSION

<b>DISCUSSION.....</b>	<b>95</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>107</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>109</b>

## LISTE DES TABLEAUX

### **RECENSION DE LA LITTÉRATURE :**

Tableau 1. Enrichissement de l'environnement des petits mammifères.....	41
---	----

### **ARTICLE :**

<u>Table 1.</u> Mean ( $\pm$ SEM) gestation duration, mean ( $\pm$ SEM) number of pups at birth and total number of deaths per group.....	90
---	----

<u>Table 2.</u> Success and unsuccessful rates (percentages) for different behavioral tests of mice pups for all experimental groups at day 3 post-delivery.....	90
--	----

## LISTE DES FIGURES

### RECENSION DE LA LITTÉRATURE

Figure 1 : Différentes fibres primaires afférentes transmettant la douleur jusqu'à une première synapse au niveau de la corne dorsale. Source: <http://lecerveau.mcgill.ca/flash/>.....23

Figure 2 : Lames de la moelle épinière. Source : <http://lecerveau.mcgill.ca/flash/>.....24

Figure 3 : Voies de conduction de la douleur. Source : Steeds, C. E. (2016). The anatomy and physiology of pain. *Surgery (Oxford)*, 34(2), 55-59.....25

Figure 4 : Graphique représentant l'allodynie et l'hyperalgésie. Source : Cohen, S. P., & Mao, J. (2014). Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*, 348, 1-12. doi: 10.1136/bmj.f7656. ....29

Figure 5 : Zones innervées par les trois branches du nerf sciatique : saphène, tibial et sural. Source : Duraku, L. S., Hossaini, M., Hoendervangers, S., Falke, L. L., Kambiz, S., Mudera, V. C., ... Ruigrok, T. J. (2012). Spatiotemporal dynamics of re-innervation and hyperinnervation patterns by uninjured CGRP fibers in the rat foot sole epidermis after nerve injury. *Molecular Pain*, 8, 61. Doi: 10.1186/1744-8069-8-61. ....37

<u>Figure 6</u> : Application d'un filament de von Frey sous la patte d'une souris.....	39
<u>Figure 7</u> : Représentation visuelle des quatre stades de cycle de reproduction de la souris femelle : proestrus, estrus, metestrus et diestrus. <u>Source</u> : Heykants, M., & Mahabir, E. (2016). Estrous cycle staging before mating led to increased efficiency in the production of pseudopregnant recipients without negatively affecting embryo transfer in mice. <i>Theriogenology</i> , 85(5), 813- 821.....	47
<u>Figure 8</u> : Représentation visuelle des catégories placentaires de différentes espèces. <u>Source</u> : PrabhuDas, M., Bonney, E., Caron, K., Dey, S., Erlebacher, A., Fazleabas, ... Yoshinaga, K. (2015). Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. <i>Nature Immunology</i> , 16(4), 328-334.....	49
<u>Figure 9</u> : Placentations de l'humain et de la souris. <u>Source</u> : Ander, S. E., Diamond, M. S., & Coyne, C. B. (2019). Immune responses at the maternal-fetal interface. <i>Science Immunology</i> , 4(31), 1-10. doi: 10.1126/sciimmunol.aat6114.....	51
<u>Figure 10</u> : Représentation visuelle de l'évolution des souriceaux. <u>Source</u> : Dutta, S., & Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. <i>Life Sciences</i> , 152, 244-248.....	57
<u>Figure 11</u> : Illustration représentant la complétion de la tâche de <i>crawling</i> au troisième jour postpartum.....	60

## **ARTICLE**

**Figure 1.** . Timeline of the research protocol.

VF = von Frey filaments mechanical sensitivity evaluations; W = study week.....91

**Figure 2.** Mechanical sensitivity in female mice in the sham surgery with standard environment

(sham SE), sham surgery with enriched environment (sham EE), and spared nerve injury surgery with standard (SNI-SE) and enriched (SNI-EE) environment groups ( $n = 8/\text{group}$ ).

Mechanical sensitivity was measured using an up–down method (50% threshold) with von Frey filaments at baseline (before surgery), 2 weeks post-surgery (post-CHX) and 1 week post-delivery. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.

\*Significant differences between the SNI-SE and SNI-EE groups compared to the sham groups at post-CHX and between the SNI-SE and all other groups at 1 week post-delivery ( $p < 0.0001$ ). .....92

**Figure 3.** Mean (S.E.M.) number of exercise wheel rotations/hr over 24 hr in the pre-gestational

(A) and gestational (B) stages in sham surgery (sham) and spared nerve injury surgery (SNI) groups of female mice with environmental enrichment ( $n = 8/\text{group}$ ). There were no differences between groups in either recording period.....93

**Figure 4.** Selected peptide results for female mice presented as normalized data based on the peak

mean areas for the sham group for relative quantification. CGRP = calcitonin-gene-related peptides; Dyn A = dynorphin A; met-ENK = met-enkephalin; leu-ENK = leu-enkephalin; NKA = neurokinin A; SNI-EE = spared nerve injury surgery + environmental enrichment

group; SNI-SE = spared nerve injury surgery + standard environment group; SP = substance P.

\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  when comparing SNI-EE to Sham for beta-endorphins. No significant difference were found between Sham, SNI-SE and SNI-EE for Dynorphin A (Dyn A), neurokinin A (NKA), Substance P (SP), calcitonin-gene-related peptides (CGRP) 1 and 2.....94

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

*ad libitum* : à volonté

A $\beta$  : fibre nerveuse A-beta, fibre sensorielle mécanique et motrice à conduction moyenne

A $\delta$  : fibre nerveuse A-delta, fibre sensorielle polymodale à conduction moyenne

ACTH : adrenocorticotrophic factor

C: fibre nerveuse sensorielle polymodale de la douleur à conduction lente

CD1 souris non-consanguine

CFA: Complete Freud Adjuvant

CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptide (peptide relié au gène de la calcitonine)

DynA : dynorphine A

EE : environmental enrichment

FSH : hormone folliculostimulante

GABA: acide gamma-amino-butyrique

GCD : ganglion de la corne dorsale

5-HT : sérotonine

IASP : International Association for the Study of Pain

IL : interleukines

IL-1 $\beta$  : interleukine 1 beta

INF : interférons

L : litre

LC : locus coeruleus

LH : Hormone lutéinisante

Leu-ENK : Leu-enképhaline

MRV : médulla rostroventrale

NA : noradrénaline

NKA: Neurokinine de type A

NKB : Neurokinine de type B

mPFC : medial prefrontal cortex

Met-ENK : Met-Enképhaline

NY: New York

OT : oxytocin

SE : standard environment

SG : substance gélatineuse

SGPA : substance grise péri-aqueducale

SM : voie spinomésencéphalique

SP : substance P

SNC : système nerveux central

SNI : Spared Nerve Injury

SR : voie spinoréticulaire

ST : voie spinothalamique

TNF $\alpha$  (TNF): Tumor Necrosis Factor alpha

USA: Unites States of America

VF : Von Frey filaments

11- $\beta$ HSD2 : 11- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase 2

Unités et spectrométrie de masse:

Da : Dalton

FWHM : full width at half maximum

g : gravité

g : gramme

h ou hr : heure

µg : microgramme

mL : millilitre

µL : microlitre

mg/kg : milligramme par kilogramme

min : minute

MS<sup>2</sup> : Product ion spectra

pH : mesure de l'acidité d'une solution

ppm ; parties par million

sec: seconde

TFA : trifluoroacetic acid

w :v : weight : volume

° : angle en degré

°C : degrés de température Celsius

Statistiques :

ANOVA : analysis of variance

F : égalité des variances

n : nombre de sujets dans un groupe

SEM : standard error of the mean

χ<sup>2</sup> : statistical test chi-square

\*: p values statistically significant



*À mes incroyables parents*

## **REMERCIEMENTS**

Un énorme merci au Docteur Pascal Vachon sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour. Un professeur qui sait inspirer ses étudiants et qui leur transmet son amour de la recherche. C'est un enseignant en or qui démontre du leadership, qui dirige ses étudiants vers le droit chemin, qui partage ses nombreuses connaissances et sa joie de vivre.

Aussi, un grand merci au Docteur Francis Beaudry sans qui les analyses des peptides n'auraient été possibles. Merci à Denise Carrier la plus précieuse des techniciennes en animaux de laboratoire qui était une source précieuse d'information lors de l'exécution du projet. Merci à Docteure Graziella Di Cristo sans qui nous n'aurions pas pu exécuter le projet au centre de recherche Sainte-Justine. Merci à Marie-Thérèse Parent pour le raffinement de tous les graphiques.

Merci à toute ma famille qui m'a aidé tout au long de cette maîtrise. Et un gros merci à Stéphane Dip, mon conjoint, qui m'a encouragé par-dessus toute mesure à tous les moments où j'en avais besoin.

## INTRODUCTION

Plusieurs femmes enceintes vivent avec de la douleur chronique, mais ne la traitent pas par crainte d'avoir des effets néfastes ou tératogènes sur le fœtus en développement (Nordeng et al., 2010). En effet, les traitements pharmacologiques existants sont connus pour pouvoir causer des effets néfastes pour le développement du fœtus. Par exemple, les morphiniques causent le syndrome de sevrage du nouveau-né (Reynolds et al., 2007). Un traitement non pharmacologique efficace serait donc une alternative très intéressante. Il permettrait de réduire la douleur chronique sans pour autant occasionner des effets néfastes pour l'être en devenir. Jusqu'à présent, aucune étude n'a présenté un moyen non pharmacologique qui permet de réduire la non douleur chronique en contexte de gestation.

L'enrichissement de l'environnement est un sujet d'actualité pour le traitement de la douleur neuropathique. Différentes études démontrent les effets positifs qu'une simple roue d'exercice avec des modèles de neuropathie chronique chez des rongeurs.

De plus, il existe présentement un grand manque au niveau de littérature en ce qui à trait des effets de la douleur chronique sur la gestation et le développement de la progéniture.

Dans ce projet de maîtrise, l'intérêt était donc d'investiguer l'effet qu'une douleur neuropathique chronique chez des souris CD1 pourrait avoir sur le développement des souriceaux. Dans un deuxième volet, l'investigation s'est poursuivie en analysant les effets qu'aurait l'utilisation d'une roue d'exercice sur la douleur neuropathique des mères ainsi que sur le développement des souriceaux. Les hypothèses de recherche sont que la douleur neuropathique aura un effet négatif sur le développement des souriceaux et que les roues d'exercice permettront un meilleur développement de la progéniture et une amélioration de la douleur chronique.

## **RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

### **INTRODUCTION**

Un des moments qui est le plus important de la vie d'une femme est sa grossesse. C'est au moment qu'elle confirme la grossesse qu'elle commence à rêver de son enfant qui se développe dans son utérus. Au cours du premier trimestre, ces femmes ressentent une panoplie d'émotions : peur, joie, craintes, espoir. Toutes souhaitent une grossesse d'évolution normale et un fœtus sans anomalies. La douleur est une expérience désagréable qui peut être ressentie de plusieurs manières différentes. Ce qui est commun cependant c'est qu'elle est perçue de manière négative. Elle amène plusieurs problèmes et complications. Donc, les futures mères vivant de la douleur chronique rencontrent alors un problème important. Souvent, elles ne veulent pas prendre de médicaments soulageant leur douleur pour ne pas engendrer des problèmes au niveau du bébé en développement. À l'opposé, celles qui décident de prendre des médicaments courent le risque que leur bébé ait des problèmes à la naissance (par exemple, de sevrage si elles prennent des opioïdes). Présentement, il y a un manque flagrant d'études concernant les femmes enceintes vivant de la douleur chronique. Les effets de la douleur chronique sont inconnus sur le fœtus en développement. Aussi, aucune étude n'est disponible sur d'autres méthodes de soulagement de la douleur dans un contexte de grossesse (par exemple, des méthodes non pharmacologiques).

De plus en plus de recherches sont effectuées avec des animaux de laboratoire. En effet, plusieurs animaux ont des systèmes comportant des similitudes avec l'humain. À cet effet, la souris est utilisée comme modèle animal en reproduction, car son placenta a plusieurs similitudes avec le placenta humain.

## **1. LA DOULEUR CHRONIQUE**

La douleur est définie par l'IASP (International Association for the Study of Pain) (2017) comme « une expérience désagréable au point de vue sensoriel et émotionnel associé avec de réels ou potentiels dommages aux tissus ». La douleur peut être subdivisée en deux grandes catégories : la douleur aiguë et la douleur chronique. Une douleur aiguë est courte en durée et d'apparition soudaine, commence suite à un stimulus nocif (thermique, chimique ou mécanique), et a le potentiel de devenir une douleur chronique (Tighe et al., 2015). Cette dernière perdure dans le temps au-delà six mois de durée (Russo et Brose, 1998). Au niveau psychologique, la douleur lorsqu'elle devient chronique est associée à des risques plus élevés de développer des symptômes dépressifs, des idées suicidaires et de l'anxiété (Gorczyca et al., 2013). Au niveau physiologique, la douleur cause des changements de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et de la température corporelle, une augmentation de la fréquence respiratoire, une dilatation des pupilles, et des réactions de sudation et de pilo-érection (Cower et al., 2015). Au niveau comportemental, les humains changent leurs comportements verbaux et non verbaux afin de communiquer la sensation désagréable qu'ils expérimentent (Keefe et Pryor, 2007). La douleur affecte les personnes de tous âges, nouveau-nés (Stevens et al., 2007) jusqu'aux personnes âgées (Dentino et al., 2017). En somme, la douleur a de multiples facettes ce qui la rend difficile à évaluer, à traiter et à soigner. Malgré sa grande importance dans le monde médical, la douleur n'a pas été souvent abordée dans le contexte de la gestation. Peu d'études ont cherché à explorer les impacts de la douleur durant la gestation. Cette expérience prend une importance tout autre avec un fœtus en développement considérant qu'elle est multifactorielle rendant son traitement difficile.

## **1.1. Fonctionnement de la nociception**

### **1.1.1 Étapes de la nociception**

La perception de la douleur ressentie commence avec quatre étapes: la transduction, la transmission, la perception et la modulation. D'abord, selon Osterweis et al. (1987), les terminaisons nerveuses spécialisées nociceptives peuvent être activées avec des mécanismes chimio-électriques initiés par des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques. Les stimuli mécaniques et thermiques provoquent une douleur de plus courte durée, contrairement aux stimuli chimiques. On appelle cette étape la transduction. Puis, le signal électrique est transmis par des fibres nociceptives spécialisées.

### **1.1.2 Fibres nociceptives**

Le signal est par la suite transmis comme un potentiel d'action à travers des fibres A $\delta$  type I et II, et des fibres C (Renn et Dorsey, 2005). Les fibres A $\delta$  transmettent le message nociceptif rapidement, sont myélinisées, et mettent en place une première douleur aiguë et bien localisée (Belmonte et Cervero, 1996). Les fibres C, contrairement aux fibres A $\delta$ , transmettent le message lentement, sont amyélinisées, et mettent en place une douleur diffuse (mal localisée) et émotionnelle (Belmonte et Cervero, 1996; Ochoa et Torebjork, 1989).

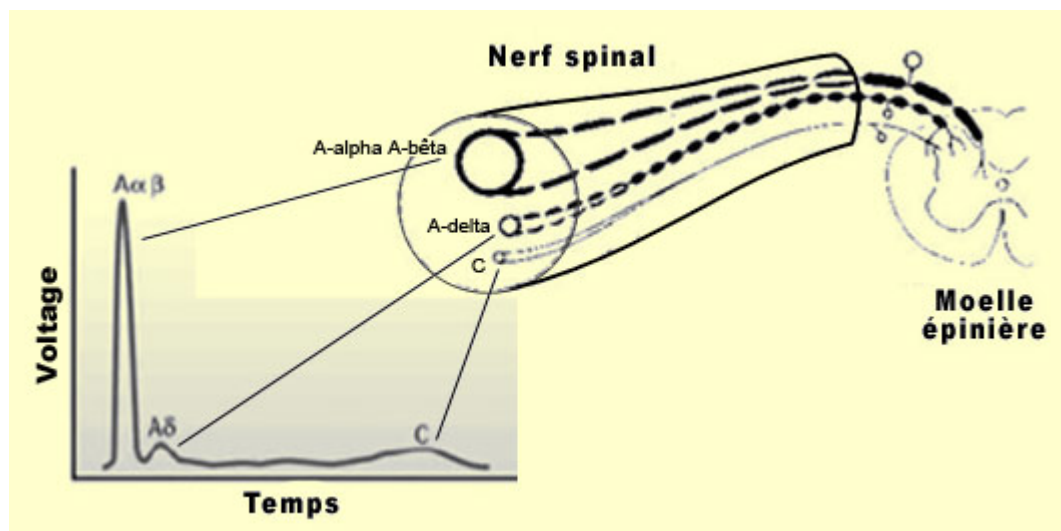


Figure 1 : Différentes fibres afférentes d'un nerf transmettant la douleur jusqu'à une première synapse au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres  $A\beta$  sont des mécanorécepteurs transmettant rapidement des signaux de toucher léger. Les fibres myélinisées  $A\delta$  transmettent rapidement la douleur aigüe et les fibres  $C$  transmettent lentement la douleur diffuse, lancinante et mal localisée. Une douleur chronique est associée à des mécanismes de sensibilisation des synapses de la moelle épinière en relation avec les fibres  $C$ . (Source : <http://lecerveau.mcgill.ca/flash/>)

### 1.1.3 Transmission de la douleur

Les fibres afférentes des nerfs périphériques font des synapses dans les couches superficielles et profondes de la corne dorsale de la matière grise de la moelle épinière. Cette information sur la douleur sera traitée dans les lames I, II et V principalement (voir figure 2).

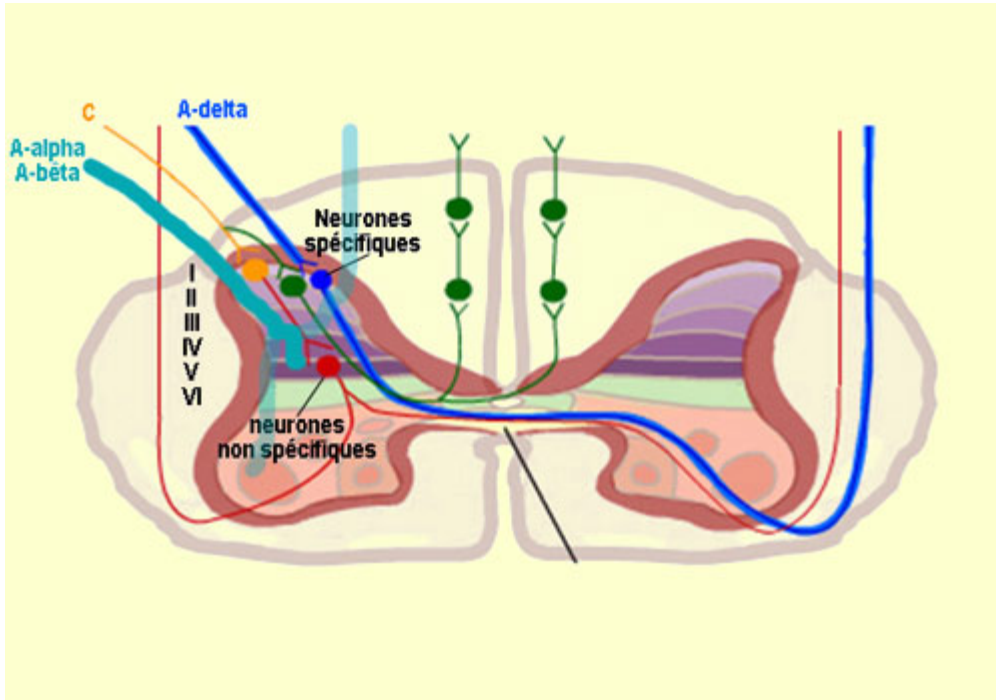
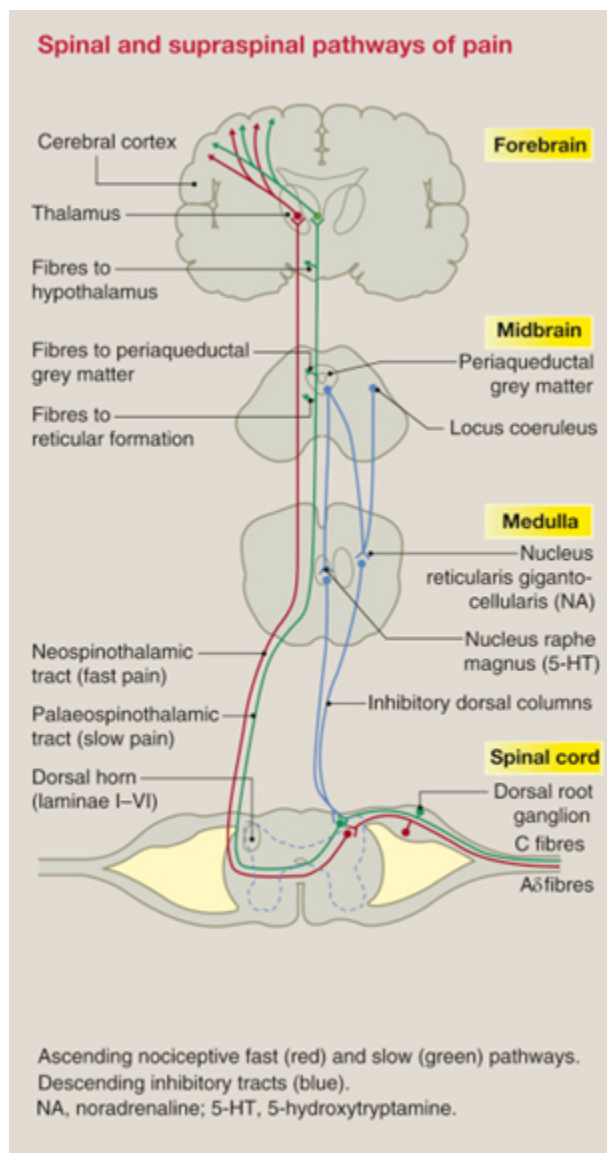


Figure 2: Représentation d'une coupe transversale de la moelle épinière montrant les différentes couches des cornes de la substance grise. Lame de Rexed (I-X) de la moelle épinière sont identifiées. Les lames se regroupent des neurones en 3 sections: I à VI pour la sensation, VII et X pour le système nerveux autonome, et VIII à IX pour la motricité. (Source : <http://lecerveau.mcgill.ca/flash/>)

Par la suite, l'influx nerveux est transmis jusqu'au système nerveux central grâce à différentes voies ascendantes (Willis, 1985). Il y a trois voies principales : la voie spinothalamique (ST), la voie spinomésencéphalique (SM) et la voie spinoréticulaire (SR). La voie ST achemine l'influx nerveux jusqu'au thalamus (Willis et al., 1979; Apkarian et Hodge, 1989). La voie SM transmet l'influx jusqu'au mésencéphale (Wiberg et al., 1987) contenant plusieurs noyaux impliqués dans le contrôle de la douleur, incluant la substance grise périaqueducule et les noyaux du raphé (Kerr,



1975; Keay et al., 1997). Finalement, la voie SR termine la transmission de l'influx nerveux au niveau de la formation réticulaire de la médulla (Millan, 1999).



**Figure 3 :** *Voies de conduction de la douleur. D'abord, les fibres A $\delta$  et C transmettent le signal nociceptif jusqu'à la moelle épinière. Dans la substance grise de la moelle, une première synapse s'effectue avec un neurone secondaire ou un interneurone. Puis, les fibres de ce deuxième neurone croisent la moelle et projettent jusqu'à différentes structures du système nerveux central*

*par différentes voies de conceptions de la douleur. Notamment, il existe la voie spinothalamique, la voie spinomésencéphalique et la voie spinoréticulaire. (Source : Steeds, 2016)*

La voie spinothalamique comporte deux divisions, l'une latérale et l'autre médiane (Marchand, 2005). Le faisceau spinothalamique latéral projette directement vers les noyaux thalamiques latéraux qui projettent à leur tour vers le cortex somatosensoriel. Ces aires corticales sont associées principalement dans la composante sensori-discriminative de la douleur. Le faisceau spinothalamique médian projette directement vers les noyaux thalamiques médians, qui eux projettent vers l'amygdala, le système limbique et le cortex frontal (aire prémotrice frontale). Ces aires corticales sont associées à l'émotion de la douleur et sont activées lors de douleur chronique.

#### 1.1.4 Modulation de la douleur

Durant la transmission de la douleur, le système nerveux tentera de diminuer la douleur ressentie par la modulation de l'influx nerveux nociceptif. Pour ce faire, la modulation peut inhiber la libération de neurotransmetteurs provenant des fibres primaires afférentes ou peut inhiber le fonctionnement des récepteurs des neurotransmetteurs sur le neurone post-synaptique (Renn et Dorsey, 2005). Trois structures modulent la douleur via des noyaux spécifiques : la substance grise périaqueducale (SGPA), le locus coeruleus (LC) et la médulla rostrale ventromédiale (MRV) qui agissent tous sur des fibres descendantes afin d'inhiber la douleur (figure 3). La SGPA exerce ses effets indirectement à travers des connexions efférentes avec des structures du tronc cérébral, dont la RVM, le noyau parabrachial. Le LC agit via des neurones noradrénergiques (NA) et la MRV via des neurones sérotoninergiques (5-HT).

## **1.2 Douleur chronique neuropathique**

La douleur neuropathique est définie comme une douleur causée par une lésion au niveau du système nerveux somatosensoriel (Murnion, 2018). Nous avons fait le choix d'établir la douleur neuropathique grâce à une chirurgie au niveau du nerf sciatique, soit le *Spared Nerve Injury* (SNI). En ligaturant et coupant le nerf tibial et péronier commun, nous établirons une douleur neuropathique chronique au niveau périphérique. Ce processus sera accompli pour les groupes expérimentaux et non pour les groupes contrôles.

### **1.2.1 Mécanismes de douleur neuropathique**

La douleur neuropathique au niveau périphérique se manifeste par : une sensibilité périphérique, des décharges ectopiques, l'allodynie, l'hyperalgésie et des interactions neuroimmunes.

Une sensibilité périphérique s'établit avec des médiateurs inflammatoires, tels que le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) et la substance P (SP), qui sont libérés par les terminaisons nociceptives (Cohen et Mao, 2014). Ces médiateurs inflammatoires à leur tour libèrent des prostaglandines, des bradykinines, des facteurs de croissance et des cytokines, qui sensibilisent les nocicepteurs.

Les décharges ectopiques sont définies comme « des pulsions électriques nerveuses qui peuvent apparaître sans stimulation ou à d'autres sites que la location du dommage » (Cohen et Mao, 2014). Elles sont causées par une production spontanée de potentiels d'action (Garcia-Larrea et Magnin, 2008). Elles peuvent être originaires du ganglion de la racine dorsale, du nerf lésé ou du nerf non lésé adjacent (Cohen et Mao, 2014).

L'allodynie est définie comme de la douleur à un stimulus normalement non douloureux (Cohen et Mao, 2014). Elle peut être mécanique, soit au toucher léger, ou thermique, soit à la chaleur. Elle est causée par une diminution des seuils de stimulations permettant de déclencher la douleur.

L'hyperalgésie est définie comme une augmentation de la réponse à un stimulus normalement douloureux (Cohen et Mao, 2014). Il existe deux types d'hyperalgésies : primaire et secondaire (Campbell et Meyer, 2006). L'hyperalgésie primaire est causée par des tissus lésés ou il y aura sensibilisation des nocicepteurs primaires afférents. L'hyperalgésie secondaire est engendrée par les tissus indemnes autour du site de blessure. Dans le contexte d'une lésion des nerfs périphériques, l'hyperalgésie secondaire joue un rôle important, car elle seule cause de la douleur au niveau des nerfs non blessés. Les nerfs ayant été endommagés ne peuvent plus transmettre l'information des neurones sensoriels jusqu'aux structures de haut niveau. L'hyperalgésie et l'allodynie sont illustrées à la figure 4.

Finalement, la lésion des nerfs contribue à l'activation des cellules immunes périphériques et les facteurs qu'elles produisent : des cytokines (facteurs de tumeur nécrosante, interleukines, facteur de croissance nerveux) et des chimiokines.

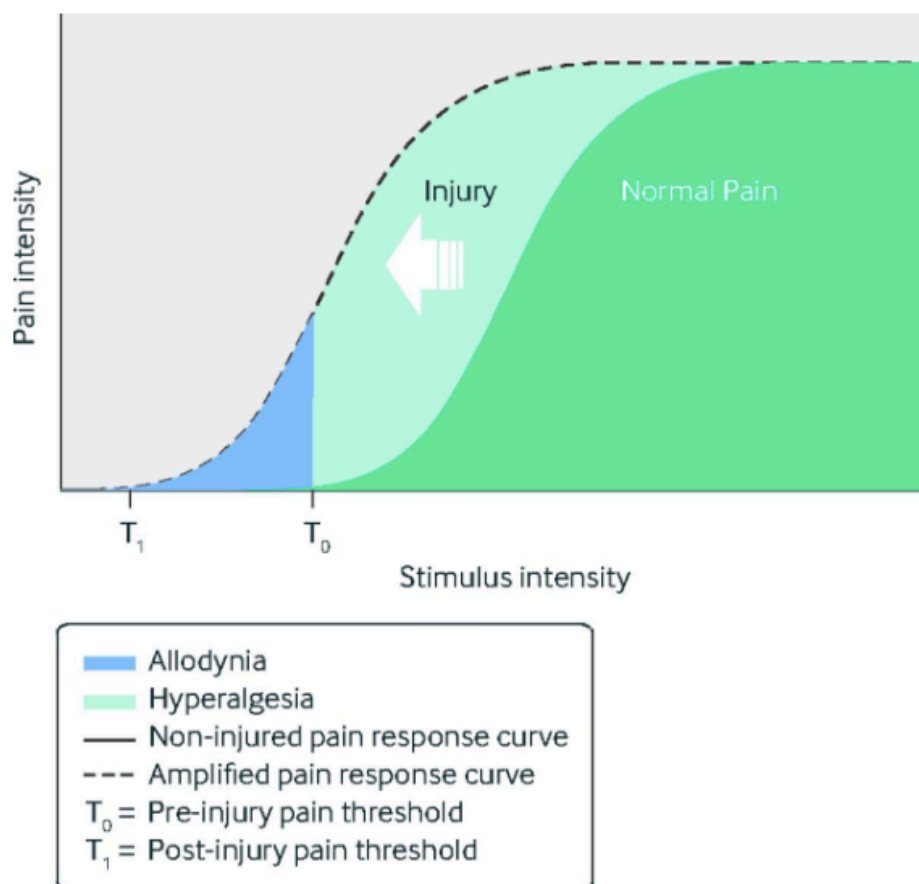


Figure 4 : Graphique représentant l'allodynie et l'hyperalgésie. L'allodynie est une douleur déclenchée par un stimulus normalement non douloureux comme le toucher léger ou la chaleur. Suite à une lésion nerveuse, le seuil du stimulus appliqué est considérablement moindre qu'avant la lésion. L'hyperalgésie est une augmentation de la réponse à un stimulus normalement douloureux. Ainsi, lorsqu'un stimulus douloureux est appliqué, la douleur normale se voit amplifiée à cause de la lésion présente. (Source : Cohen et Mao, 2014)

### 1.2.2 Neuropeptides de douleur

Plusieurs peptides sont associés à la perception et la modulation de la douleur dans le système nerveux central. Le laboratoire du Dr Francis Beaudry, en collaboration avec le laboratoire du Dr Pascal Vachon, avait déjà mis en évidence certains peptides algogènes dans la moelle épinière tels

que la substance P (SP) et le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) (Beaudry et al., 2009; Pailleux et al., 2013; Vachon et al., 2013), neurokinine A (NKA) (Pailleux et al., 2013), dynorphine A (Beaudry et al., 2009) et des opioïdes endogènes (Saidi et Beaudry, 2017). Pour notre projet, tous ces peptides ont été analysés par spectrométrie de masse. Les méthodes analytiques pour la détection de ces peptides sont décrites dans les articles cités.

#### 1.2.2.1 Les tachykinines

La substance P (SP), faisant partie de la classe des tachykinines comprenant également la neurokinine A (NKA) et la neurokinine B (NKB), est un neuropeptide ayant des fonctions de neurotransmetteur et de neuromodulateur. Comme pour le CGRP, la SP est libérée par les terminaisons des fibres nociceptives et va activer des neurones au niveau de la corne postérieure de la moelle. C'est également un puissant vasodilatateur. Dans le système nerveux central, la SP est associée à la régulation des troubles de l'humeur, de l'anxiété et des nausées (Costentin, 2000). Au niveau du cerveau, la SP est associée à des fonctions dans le stress, l'anxiété et la dépression (Ebner et Singerwald, 2006; Holsboer, 2003). Son rôle dans les émotions est associé à l'amygdale et l'hippocampe (Ebner et Singerwald, 2006). Aucune publication n'associe un rôle de la SP dans la douleur en ce qui concerne les régions corticales et sous-corticales.

La NKA, comme la SP, a un rôle dans le stress induit par des désordres neurologiques, tels que la dépression, la schizophrénie et l'épilepsie (Nagano et al., 2011) ainsi que des problèmes moteurs, telle que la maladie de Parkinson (Pantaleo et al., 2010). La NKA augmente également dans le système nerveux central lors d'inflammation, de trauma et d'infection du tissu cérébral (Pantaleo et al., 2010). La NKA est retrouvée principalement dans le cortex frontal, le cortex cingulaire et

l'amygdala; structures qui sont également impliquées dans la douleur. Par contre la NKB ne semble pas jouer de rôle dans la douleur (Goodman et al., 2014).

En conclusion, les tachykinines (SP, NKA, NKB) ne semblent pas jouer un rôle dans la perception et la modulation de la douleur dans le système nerveux central.

#### 1.2.2.2 Le peptide relié au gène de la calcitonine

Le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) joue un rôle important comme neurotransmetteur de la moelle épinière, au niveau de la corne dorsale, pour les nerfs périphériques sensoriels et du nerf trijumeau (Rapoport et Edvinsson, 2019; Tepper, 2018). Il a une action vasodilatatrice d'où son importance dans les migraines. Au niveau du système nerveux central de l'humain, le CGRP est concentré principalement dans l'hypothalamus et le locus coeruleus, et des concentrations faibles sont retrouvées dans le reste du cerveau, les noyaux sous-corticaux (caudé, putamen et amygdala), et le cervelet (Tiller-Borcich JK et al., 1988). Par contre chez les rats (Warfvinge et Edvinsson, 2019), on retrouve du CGRP dans la plupart des neurones du cortex cérébral, de l'hippocampe, du cervelet, des noyaux thalamiques et hypothalamiques, et des noyaux du tronc cérébral. Les fonctions du CGRP dans ces différentes régions restent inconnues et donc un lien avec la douleur reste incertain.

#### 1.2.2.3 Les dynorphines

Les dynorphines sont des peptides opioïdes composés de trois principaux éléments : la dynorphine A (DynA), la dynorphine B (DynB) et la grande dynorphine (Day et al., 1998). On les retrouve dans tout le système nerveux central, mais principalement l'hypothalamus, la médulla, le pont, le mésencéphale et la moelle épinière (Goldstein et Ghazarossian, 1980). Les dynorphines ont

plusieurs fonctions. Elles jouent un rôle d'analgésique, dans la dépression et le stress (Shirayam et al., 2004), l'appétit et le rythme circadien (Przewłocki et al., 1983) et la régulation de la température (Nyberg et Hallberg, 2007). Les dynorphines ont une fonction dans le contrôle de la douleur qui est principalement dans la moelle épinière (Corder et al., 2018). En conclusion, les dynorphines ont plusieurs rôles associés au système nerveux central, dont le stress qui sera possiblement important dans un modèle de douleur chronique. Cependant, les dynorphines n'ont aucune fonction importante pour le contrôle de la douleur au niveau cérébral.

#### 1.2.2.4 L'ocytocine

L'ocytocine est un neuropeptide sécrété par les noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus et excrété par la neurohypophyse pituitaire, et agissant principalement sur l'utérus et les glandes mammaires. Des études récentes suggèrent qu'elle pourrait avoir un rôle dans la reconnaissance sociale et l'empathie (Oettl et al., 2016), l'anxiété (Alley et al., 2019), et les comportements maternels (Markova et Sipsova, 2019). L'ocytocine a également un rôle très important dans la modulation de la douleur. Les neurones ocytocinergiques projettent à différentes régions du cerveau (cortex orbitofrontal, cingulaire et de l'insula) qui sont impliquées dans l'émotion et la perception de la douleur (Vargas-Martinez et al., 2014). De façon spécifique, la région préfrontale médiane est impliquée dans la douleur chronique dans les modèles de lésions nerveuses périphériques chez les rats (Metz et al., 2009). Dans la littérature, aucun article n'a étudié le rôle de l'ocytocine dans la modulation de la douleur corticale, par contre il y a des évidences très claires de son rôle au niveau de la moelle épinière (Boll et al., 2018). Malgré une fonction dans les comportements maternels, nous suspectons une fonction algogène de l'ocytocine dans notre projet qui pourrait être mise en évidence dans le cortex frontal.



#### 1.2.2.5 Les endorphines et les enképhalines

Il existe plusieurs endorphines (ex. alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ )) dont certaines jouent un rôle prépondérant dans l'analgésie et que l'on retrouve autant dans le cerveau que la moelle épinière et d'autres tissus du corps (Gu et al., 2017; Henry et al., 2017). La  $\beta$ -endorphine est la plus étudiée pour ses rôles dans la douleur, les comportements sexuel et maternel, et la récompense. Elle est retrouvée principalement au niveau de l'hypothalamus, la glande pituitaire, le thalamus, l'amygdala et plusieurs structures du tronc cérébral ayant des fonctions dans la douleur (Finley et al., 1981; Wilkes et al., 1980), mais également dans le striatum et le cortex cérébral (Bivehed et al., 2017). Pour induire une analgésie, la  $\beta$ -endorphine agit directement sur les récepteurs morphiniques *mu* (Foley et al. 1979). Elle a également la capacité d'inhiber le GABA (neurotransmetteur inhibiteur) qui va permettre la relâche de la  $\beta$ -endorphine, et permettre ainsi la relâche de dopamine qui contribuera également à l'effet analgésique (Dalayeun et al., 1993). Donc la  $\beta$ -endorphine devrait être augmentée au niveau cortical lors d'une douleur chronique et comme les endorphines augmentent avec l'exercice (Harber et Sutton, 1984), on pourrait s'attendre à un effet analgésique sur la douleur des mères gestantes qui font de l'exercice durant la gestation. En ce qui a trait d'autres types d'endorphines, l' $\alpha$ -endorphine joue un rôle dans le système endocrinien et en ce qui concerne la  $\gamma$ -endorphine ses fonctions restent spéculatives.

Les enképhalines sont des pentapeptides endogènes jouant un rôle important dans l'inhibition de la douleur et du stress (Henry et al., 2017; Corder et al., 2018). On les retrouve dans plusieurs régions importantes de la modulation de la douleur (cortex préfrontal et amygdala) ainsi que l'inhibition du stress (hypothalamus). Les enképhalines ont un rôle dans la résilience au stress chronique en relation avec la douleur chronique (Henry et al., 2017).

En conclusion, certains des peptides sélectionnés pour notre recherche n'ont pas de rôle dans la douleur, et ils devraient nous servir de contrôle. Par contre, d'autres, tels que les opioïdes et l'ocytocine ont clairement une fonction algogène mais également jouent un rôle dans le stress. Ces derniers devraient être augmentés avec une douleur chronique, et si l'exercice diminue la perception de la douleur, la concentration devrait diminuer dans le tissu cérébral.

### 1.2.3 Traitement pharmacologique lors d'une grossesse

Selon un rapport statistique des États-Unis, 14 % de femmes enceintes ont rempli une prescription pour des opioïdes lors de la période anténatale (Bateman et al., 2014). Des douleurs communes lors d'une grossesse comprennent les douleurs lombaire, pelvienne, abdominal et articulaire (Shah et al., 2015). Un total de trois médicaments sont permis lors de la grossesse, soient l'acétaminophène (analgésique), la lidocaïne (anesthésiant local) et la nalbuphine (opioïde) (Shah et al., 2015). Selon les études, ces médicaments n'ont pas démontré qu'ils causaient des effets néfastes sur le fœtus en développement.

Cependant, d'autres médicaments sont prescrits pouvant causer des effets tératogènes sur le fœtus. Les antiinflammatoires non stéroïdiens sont proscrits lors du troisième trimestre, car ils peuvent fermer prématurément le ductus arteriosus (Koren et al., 2006). Les opioïdes peuvent causer un syndrome du sevrage du nouveau-né et des malformations (Reynolds et al., 2007). L'aspirine augmente le risque de saignement maternel et fœtal ainsi que le risque de disruption vasculaire (Babb et al., 2010). Afin de diminuer les risques cités ci-dessus, les médecins prescrivent ces médicaments à faibles doses. Cependant, le risque reste toujours présent. C'est pourquoi plusieurs femmes enceintes craignent utiliser ces médicaments et discontinuent leur traitement (Nordeng et al., 2010). Si une douleur chronique sévère n'est pas traitée des problèmes de santé tels que

l'hypertension, l'anxiété et la dépression causeront une grossesse problématique (Bruehl et al., 2005; Whitten et al., 2005). Ainsi, une solution non pharmacologique permettant de diminuer la douleur chronique lors de la grossesse serait la meilleure option. Cependant aucune étude n'a encore été effectuée sur le sujet.

### **1.3 Évaluation de la douleur neuropathique**

#### **1.3.1 Modèles animaux**

Différents modèles animaux permettent l'étude de la douleur neuropathique. Les grandes catégories comprennent: neuropathie induite par l'administration de médicaments, par des maladies, ainsi que par des lésions de nerfs périphériques (Jaggi et al., 2011).

Il est possible d'induire une neuropathie avec des médicaments. Notamment, les antinéoplasiques tels que la vincristine, l'oxaliplatine, le cisplatine et le docétaxel induisent une neuropathie par une dégénération des nerfs périphériques (Jaggi et al., 2011). Cependant ces modèles demandent souvent des injections intraveineuses ou intramusculaires selon des horaires précis ce qui comprend plusieurs manipulations des animaux pouvant causer du stress. Il est aussi possible d'utiliser des antirétroviraux qui induisent des neuropathies douloureuses et qui sont exacerbés avec le virus de l'immunodéficience humaine (Dalakas, 2001). En administrant ces médicaments par voie orale, la neuropathie prendra environ quinze semaines à se développer (Patterson et al., 2000) ce qui représente une longue période de temps et n'est pas pertinent pour notre projet.

Certaines maladies sont aussi connues pour le développement secondaire d'une neuropathie périphérique, telles que le diabète, le cancer de l'os, l'immunodéficience virale, l'arthrite et la

névralgie herpétique. En contrepartie, ces modèles nécessitent tous l'induction d'une condition qui pourrait confondre nos résultats.

Pour créer une neuropathie à partir d'une lésion d'un nerf périphérique plusieurs options se présentent. Il est possible de performer une axotomie en ligaturant et coupant les nerfs sciatique et saphène afin de créer une dénervation complète (Wall et al., 1979). Cependant, cliniquement, il est rare qu'un humain présente ce type de lésion (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2018) et n'est donc pas représentatif. Il est aussi possible d'effectuer un modèle de constriction chronique par l'entremise de trois ligatures lâches au niveau du nerf sciatique (Bennett et Xie, 1988) ce qui reproduit un syndrome de compression des nerfs. Ce modèle dure 7-8 semaines et dépend du degré de serrement des ligatures (Ro et Jacobs, 1993). Plusieurs autres modèles peuvent être employés pour induire une neuropathie périphérique, mais le meilleur est de loin celui du Spared Nerve Injury (SNI). Décrit pour la première fois par Decostred et Woolf (2000), il consiste en la ligature et la résection des nerfs tibial et péronier commun. Il permet une comparaison entre les différences de sensibilité mécanique et de sensibilité thermique entre les groupes expérimentaux grâce à la sensibilisation des neurones indemnes envoisinant le nerf sciatique. Aussi, il a été démontré à de nombreuses reprises que ce modèle étudie une neuropathie à long terme allant jusqu'à huit semaines (Shields et al., 2003; Parent-Vachon & Vachon, 2018; Vachon et al., 2013). C'est pourquoi nous avons retenu ce modèle pour effectuer notre projet de recherche.

### 1.3.2 Chirurgie au niveau du nerf sciatique

Pour induire une douleur neuropathique, nous effectuerons une ligature des branches tibiale et fibulaire commun du nerf sciatique selon la technique décrite par Decostred et Woolf (2000).

Premièrement, avant la chirurgie, nous évaluerons le niveau du seuil de douleur mécanique des souris en appliquant les filaments de von Frey (voir Section 1.4.3).

En préparation pour la chirurgie, dans un endroit calme, la souris sera anesthésiée avec un gaz en concentration de 1.5 L d'oxygène et de 2.5 L d'isoflurane. Puis, nous vérifierons l'absence des réflexes en pinçant le bout de sa queue et ses pattes avec des pinces afin d'évaluer son niveau de conscience. Lorsqu'elle est inconsciente, la section du genou à la hanche de la patte gauche est rasée avec un rasoir électrique. La souris est placée sur le côté droit et sa patte gauche est surélevée avec des gazes. Finalement, le site opératoire est désinfecté avec de l'éthanol.

La chirurgie commence avec une incision de 1 cm en direction longitudinale proximale au genou. La peau et la couche musculaire seront ouvertes par dissection mousse avec des ciseaux stériles. Les trois nerfs naissant du nerf sciatique sont visualisés soit les nerfs tibial, péronier commun, et sural. Les nerfs tibial et péronier commun sont suturés avec un fil 6-0 en faisant un nœud chirurgical (voir figure 5). Par la suite, ces deux branches sont coupées au-dessous du nœud chirurgical. Finalement, la peau est refermée avec des points de suture avec un fil 6-0.

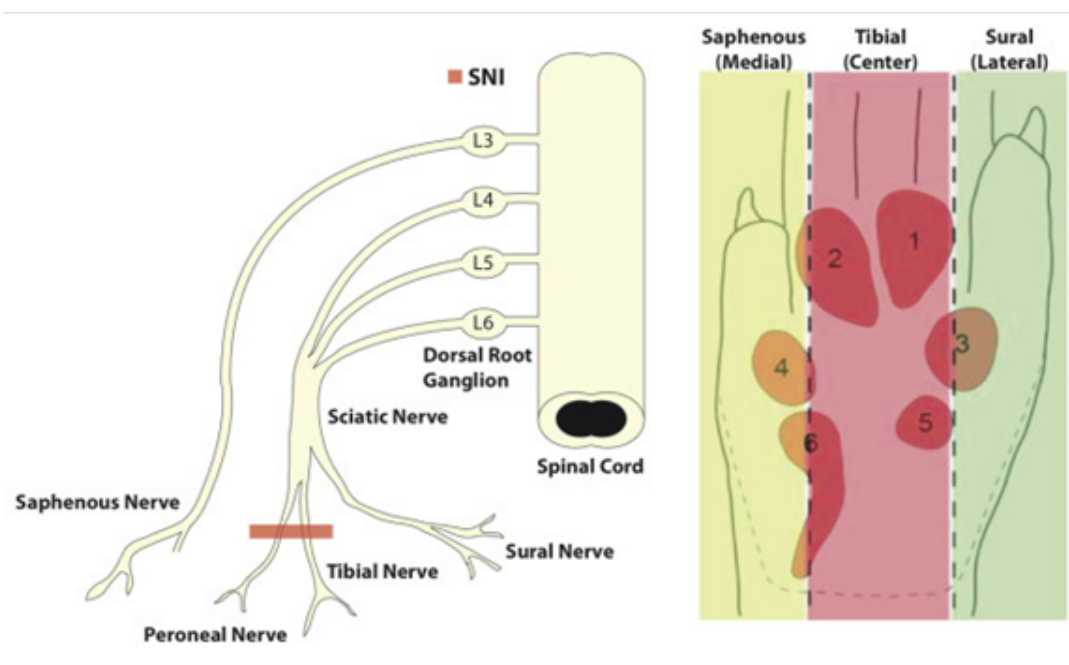


Figure 5 : *La chirurgie du Spared Nerve Injury consiste à une complète dénervation des nerfs tibial et du péronier commun. Les sections des nerfs sural et saphène demeurent cependant innervées, donc permettant le développement d'une douleur neuropathique chronique au niveau de ces zones grâce à une hyperalgésie secondaire de ces tissus. Une hyperalgésie est une douleur déclenchée autour des tissus lésés lors d'une blessure. (Jaune = Nerf saphène, Rouge = Tibial, Vert = Sural)*  
(Source : Duraku et al., 2012)

Post chirurgicalement, la souris reçoit de l'ampicilline par injection en concentration de 25 mg/kg (Ampicilline 250mg, Pfizer). La souris est placée dans sa cage sous une serviette en papier. Deux semaines plus tard, nous ferons une nouvelle évaluation du seuil de douleur mécanique avec les filaments de von Frey afin de confirmer l'induction de douleur neuropathique.

### 1.3.3 Test pour évaluation de la douleur neuropathique

Selon les méthodes précédemment publiées (Vachon et al., 2013 ; Chaplan et al., 1994 ; Richner et al., 2011), nous évaluerons la sensibilité mécanique des surfaces plantaires des pattes arrière. La souris est placée sur une table de grillage métallique dans un cylindre de plastique rouge translucide. L'acclimatation à cet environnement se fait sur une période d'une heure. Suite à cette acclimatation, les souris passent d'un comportement actif à passif. Puis, nous appliquerons le filament sur la patte afin qu'il plie sur une période de quatre sec ou jusqu'à ce que la souris retire sa patte. Le filament doit être appliqué sur la partie latérale de la patte. La patte ayant subi la résection des branches du nerf sciatique se verra alors désensibilisée aux surfaces innervées par le nerf sural et péronier commun.

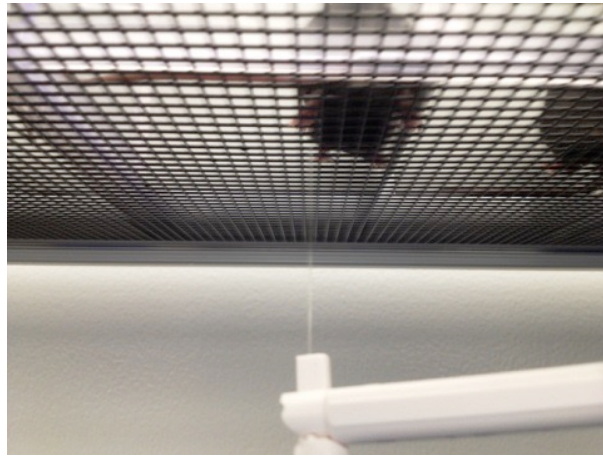


Figure 6 : *Application d'un filament de von Frey sous la patte d'une souris*

Ce test est fait avec une méthode *up-down* (Chaplan et al., 1994; Bonin et al., 2014). Le test débute avec un filament de diamètre moyen. Si l'animal ne réagit pas on test avec un fils plus gros, s'il réagit on prendra un fils plus petit pour déterminer le fils le plus petit pour obtenir une réponse comportementale. Après trois tests avec une réponse positive, le plus petit filament ayant obtenu une réponse positive sera celui retenu comme le seuil de sensibilité. Les deux pattes doivent être évaluées en suivant le même protocole. Les filaments de von Frey utilisés sont manufacturés par la compagnie Bioseb.

## **2. ENRICHISSEMENT DE L'ENVIRONNEMENT**

Il n'est pas normal qu'un humain présente une douleur chronique neuropathique puisque cette douleur n'exerce aucune fonction. Il est donc important de la traiter afin qu'elle n'ait pas d'effets néfastes ou qu'elle n'engendre pas de complications. Plusieurs solutions pharmacologiques sont disponibles présentement. Cependant, lors d'une grossesse, plusieurs mères sont réticentes à prendre de la médication; la cause principale étant qu'elles ont peur de causer des déformations ou des effets nocifs au fœtus en développement. Notre idée est donc d'introduire une option non pharmacologique pour ces mères atteintes de douleur neuropathique. Pour évaluer l'effet de l'enrichissement de l'environnement sur les mères et les nourrissons, nous allons d'abord induire la douleur neuropathique chez des souris CD1. Puis, nous introduirons une roue d'exercice deux semaines suite à la chirurgie aux groupes d'environnement enrichi. Ce modèle permettra d'évaluer l'effet de l'exercice sur la gestation. Nous évaluerons l'utilisation des roues avec des roues d'exercice informatisées à deux moments du protocole; avant la gestation et lors de la gestation. Ceci nous permettra de comparer le niveau d'activité physique face au statut gestationnel de l'animal.

### **2.1 Définition de l'enrichissement de l'environnement**

Le terme d'enrichissement de l'environnement a été introduit en 1991 par le US Department of Agriculture dans le document Animal Welfare Regulations. Il est défini comme le moyen d'exprimer des activités non-traumatisantes spécifiques aux espèces animales. Des stimuli environnementaux pourront alors permettre l'expression de comportements et d'activités mentales spécifiques aux espèces et ainsi favoriser le bien-être animal. Pour être jugé utile on devra évaluer



l'efficacité de l'enrichissement et la présentation aléatoire d'objets est parfois nécessaire pour éviter l'ennui et la non-utilisation de ces objets. Il y a des objets reliés aux fonctions biologiques des animaux, et qui sont associés à la survie de ceux-ci tels qu'un abri pour se cacher, du matériel pour faire un nid, des partenaires sociaux, des objets favorisant la recherche de nourriture, et des objets non-reliés à des fonctions biologiques tels que des jouets, de miroirs, le son d'une radio. Ces modifications de l'environnement doivent faire partie intégrale du protocole de recherche, sont souvent proposés par le chercheur, et doivent être approuvés par le comité d'éthique. Les tableaux ci-dessous donnent des exemples de l'enrichissement de l'environnement des petits mammifères et des primates, utilisés en recherche.

**Tableau 1 - Enrichissement de l'environnement des petits mammifères**

<b>Souris et rats (et autres petits rongeurs)</b>	
Plancher	Différentes litières (bois, maïs, papier, paille...)
Surface de l'habitable	Favoriser une grande surface, différents niveaux, couloirs
Nourriture séchée	Graines de tournesol, suppléments commerciaux, céréales, fruits
Ronger	Morceaux de bois pour favoriser le mordillement
Nombre d'animaux	Favoriser les groupes (ne pas laisser les animaux seul)
Jouets	Tubes, billes, objets de forme diverses
Exercice	Favoriser une grande surface, utilise une roue d'exercice
<b>Lapins</b>	
Nourriture	Laitue, kale, banane
Nombre d'animaux	Favoriser les groupes (ne pas laisser les animaux seul)
Jouets	Balles de plastique, objets de forme diverses
Exercice	Favoriser une grande surface
<b>Chiens et chats</b>	
Jouets	Perchoirs, balles

Environnement	Grandes surfaces, formation de groupe, exercice
Nourriture	Nourriture en boîte
<b>Primates</b>	
Social	Formation de groupes et de paires Favoriser le contact humain Permettre le l'épouillage
Nourriture	Fruits et légumes frais, distributeur de nourriture
Objets	Miroirs, balles, tapis synthétique, fenêtre, papier, boîtes, jeux
Autres	Télévision, musique, eau
Exercice	Cages de jeux, grandes surface, cordes, structures de bois

L'enrichissement a plusieurs effets sur le bien-être des animaux de laboratoire. Pour les rongeurs, un environnement enrichi permet de réduire la douleur chronique (Parent-Vachon et Vachon, 2018), le stress et l'anxiété (McCreary et Metz, 2016 ; Lehmann et Herkenham, 2011). Pour les primates, différentes techniques d'enrichissement de l'environnement promeut un bien-être général évalué à court terme (animaux moins agressifs, plus d'activité physique effectuée) (Jacobsen et al., 2010). L'enrichissement de l'environnement est aussi important au point de vue physique que social. L'enrichissement de l'environnement physique a même un plus grand effet que celui de l'environnement social sur la douleur chronique inflammatoire (Gabriel et al., 2010). L'exercice physique seul permet de réduire la douleur dans une variété de conditions (douleur lombaire, fibromyalgie et ostéoarthrite) (Hayden et al., 2005 ; Gowans et al., 2004 ; Malmros et al., 1998). La vue d'ensemble de ces moyens pour favoriser l'enrichissement de l'environnement nous permet de voir que l'exercice n'est qu'un moyen, parmi tant d'autres de favoriser le bien-être animal, et notre étude ne portera que sur cet aspect.

Il existe plusieurs types différents d'enrichissements de l'environnement et différentes définitions. Nous utiliserons la définition de Ng et al. (2015) qui définit un enrichissement de l'environnement comme: « une intervention conçue pour faciliter l'activité physique (moteur et sensoriel), cognitive et sociale en équipant et organisant l'environnement de manière structurée et stimulante ». De plus, Tai et al. (2018) ajoute que tout type d'enrichissement devrait être stimulant, structuré, volontaire et non-stressant. Il devrait aussi faciliter la pratique d'activités normales.

Dans cette optique, nous avons décidé que l'enrichissement de l'environnement pour nos souris consisterait en l'ajout d'une roue d'exercice pour les groupes d'environnement enrichi. Ainsi, cette roue permettra un exercice volontaire, non-stressant et stimulant au point de vue physique.

## **2.2. L'enrichissement de l'environnement et douleur neuropathique**

Il a été démontré qu'un enrichissement de l'environnement permet une diminution du seuil de douleur dans les patients atteints de douleur neuropathique chronique (Tai et al., 2018). L'enrichissement de l'environnement pourrait donc être une approche thérapeutique non-invasive qui permettrait de réduire la douleur chronique des femmes enceintes. Chez les animaux un enrichissement de l'environnement utilisant principalement une roue d'exercice permet 1) la déméthylation de l'ADN dans le cortex préfrontal médial (zone de douleur) a été inversé (Tajerian et al., 2013), 2) l'atténuation de l'allodynie et de l'hyperalgésie associées avec une réduction des marqueurs (substance P, CGRP et chimiokines) de sensibilisation de douleur centrale (Grace et al., 2016; Vachon et al., 2013; Ye et al., 2018), 3) la rétention de l'inhibition de GABA (Tai et al., 2018), 4) la restauration de l'homéostasie de la neurotrophine et de l'acétylation des histones (Tai et al., 2018), et 5) l'induction d'une analgésie en modulant les cytokines et les neurotransmetteurs inflammatoires, en libérant des opioïdes endogènes dans le système nerveux central et périphérique (Kami et al., 2016; Kami et al., 2017).

### **2.3 Roues d'exercice informatisées**

Pour évaluer l'activité physique chez des souris gestantes, nous utiliserons des roues d'exercice informatisées. Ces roues ont été utilisées et validées par l'entremise d'études précédentes (Goh et Ladiges, 2016; Sanchez-Roige et al., 2014). Comme ces roues sont volumineuses dans les cages, nous pensons changer leur roue d'exercice standard le matin pour y mettre celle qui est informatisée, ceci pour les groupes faisant de l'exercice. L'acquisition des données sera sur une durée de 24h sur quelques reprises, ce qui devrait être représentatif de l'activité physique des animaux. Ces roues permettent de mesurer le nombre de tours de la roue d'exercice par heure ainsi que le nombre de tours de roue total sur 24h.

### **3. LA REPRODUCTION**

Notre deuxième hypothèse de recherche est d'évaluer si des changements s'observeront chez les souriceaux de mères vivant de douleur neuropathique sans roue d'exercice. Pour ce faire, il nous sera nécessaire de choisir un modèle animal qui représente une gestation humaine. Nous devrons aussi procéder à des manœuvres respectant les phases de la reproduction de nos souris.

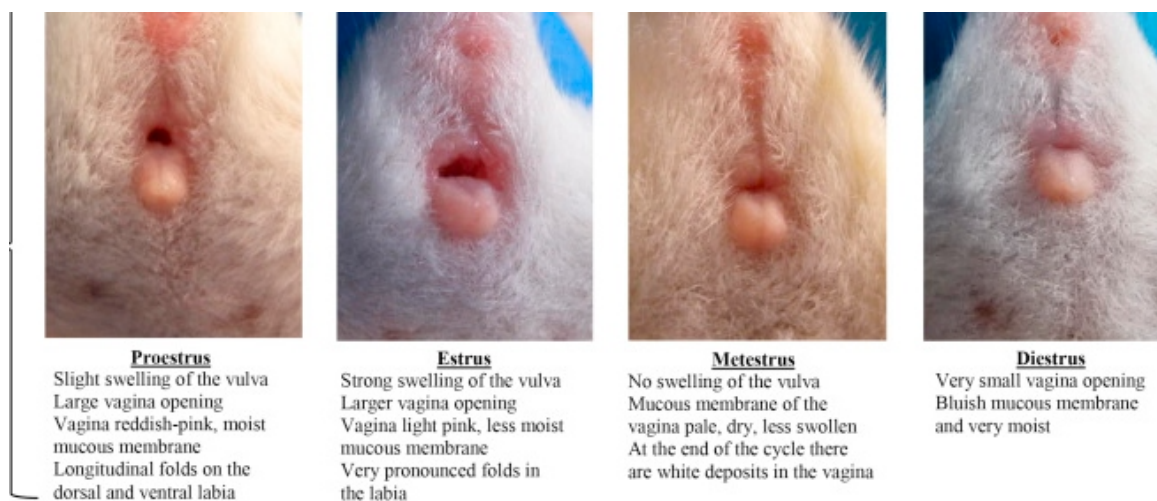
#### **3.1 Modèles animaux**

Selon Grigsby (2016), il existe différentes espèces permettant l'étude de la gestation. Ces modèles se rapprochent le plus possible de la gestation humaine. Premièrement, les primates représentent le modèle de reproduction qui ressemble le plus à l'humain : une gestation longue, la régulation de la stéroïdogénèse dans le placenta, un utérus unicorne, des contractions utérines lors de l'accouchement et un placenta bidiscoïde hémochorial. Cependant, la limitation principale de ce modèle est que l'achat et l'entretien d'un primate est très dispendieux. Aussi, l'invasion des trophoblastes est considérée superficielle chez ces animaux alors qu'elle est profonde chez l'humain. Il est aussi possible d'utiliser un cochon d'inde comme modèle. Cette espèce et les humains ont de hautes concentrations de progestérone à travers toute la gestation. Leur parturition se produit aussi lorsque la progestérone augmente. Cependant, ils présentent des placentas différents, il est épithéliochorial et diffus chez le cochon d'inde. Les moutons sont une autre espèce pouvant être utilisée. L'avantage principal de ce modèle est la similarité entre la structure vasculaire du fœtus et du placenta chez les humains et les moutons. Cependant, leur placenta est largement différent de l'humain. Finalement, les rongeurs ont de nombreux avantages comme modèle de reproduction: un placenta hémochorial, des conditions de logement faciles, des coûts moindres et une gestation courte de 20-22 jours. Cependant, une gestation courte n'est pas

représentative d'une grossesse humaine moyennant 266 jours. Nous avons choisi d'effectuer notre protocole avec des souris pour les avantages cités ci-dessus, mais aussi, car il avait été déjà démontré que l'introduction d'une roue d'exercice chez des souris neuropathiques CD1 mâles diminuait significativement, et de façon importante, leur neuropathie (Vachon et al., 2013).

### **3.2 Étapes de la reproduction chez la souris**

La femelle a quatre stades œstraux distincts : proestrus, estrus, metestrus, diestrus (figures 7 et 8). Lors du proestrus, le vagin est légèrement enflé et est de couleur rosé-rouge (Heykants et Mahabir, 2016). Lors de ce stade, une augmentation d'estrogène mène à un pic d'hormone lutéinisante (LH) et d'hormone folliculostimulante (FSH) qui provoque l'ovulation (Parkening et al., 1982). Lors du prochain stade l'estrus, la vulve est très enflée, l'ouverture vaginale est plus grande et les plis labiaux sont très prononcés (Heykants et Mahabir, 2016). Au point de vue hormonal, l'estrogène est élevé au matin et retombe à des concentrations basales en fin de journée (Walmer et al., 1992). Lors du metestrus, la vulve ne paraît pas œdématiée et des dépôts blanchâtres vaginaux sont visibles (Heykants et Mahabir, 2016). Aussi, les concentrations d'estrogène sont très basses (Walmer et al., 1992). Finalement, lors du diestrus, l'ouverture du vagin est refermée. Lors de ce stade, l'estrogène commence à nouveau à augmenter (Walmer et al., 1992). Les concentrations de LH et FSH sont basses à travers l'estrus, le metestrus et le diestrus (Parkening et al., 1982).



**Figure 7 :** Représentation visuelle des quatre stades de cycle de reproduction de la souris femelle : proestrus, estrus, metestrus et diestrus. Lors du proestrus, une large ouverture vaginale et des muqueuses rosé-rouge sont visibles. Lors de l'estrus, la vulve est œdématisée, le vagin est encore plus ouvert et les plis labiaux sont très prononcés. Lors du metestrus, la vulve n'est plus enflée et des dépôts vaginaux blanchâtres sont visibles. Lors du diestrus, le vagin est refermé. (Source : Heykants et Mahabir, 2016)

Le cycle œstral peut être perturbé par trois effets du contexte environnemental. D'abord, en logeant une femelle avec d'autres femelles, le diestrus se voit allongé de plusieurs semaines (Van der Lee et Boot, 1955). C'est ce qu'on appelle l'effet Lee-Boot. Puis, en introduisant des phéromones mâles, l'estrus débute alors au même moment chez les femelles ; connu comme l'effet Whitten (Whitten, 1966). Finalement, chez une femelle gestante, l'introduction d'un mâle inconnu de la femelle mène à un avortement spontané des souriceaux (Bruce, 1960). Cette femelle sera disponible pour s'accoupler avec le nouveau dans trois à six jours suite à l'avortement.

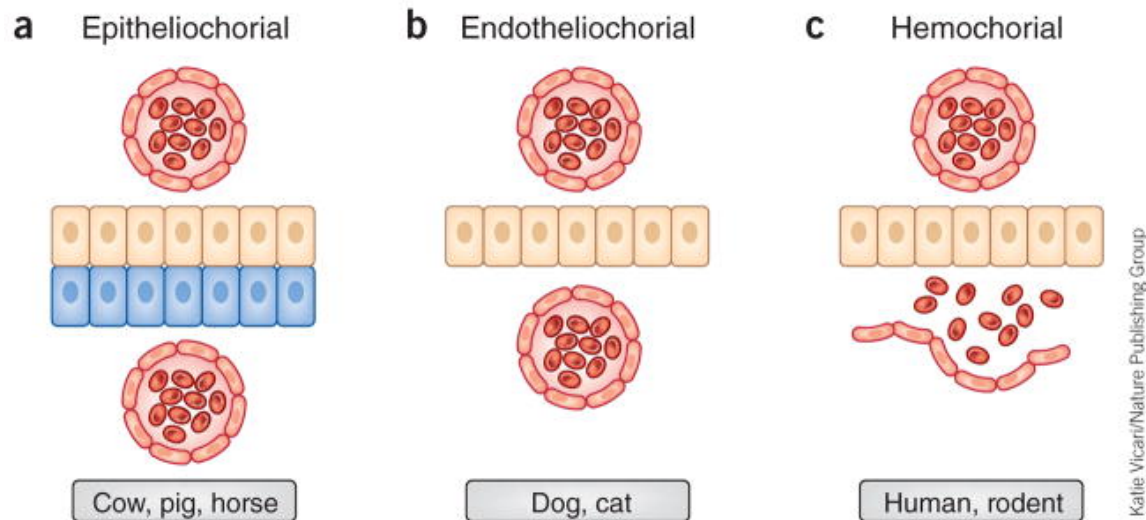
De manière générale, il est possible de savoir si une femelle est gestante en vérifiant visuellement son ouverture vaginale (Behringer et al., 2016). Un bouchon vaginal est visible lorsqu'un mâle a éjaculé dans le vagin de la femelle. Ce bouchon signifie généralement un accouplement réussi.

Dans notre protocole expérimental, en prenant en considération tous ces effets, nous placerons deux femelles par cage afin de annuler leurs cycles œstraux. Lors de la troisième semaine, nous effectuerons des chirurgies : *Spared Nerve Injury* (neuropathie) pour les deux groupes expérimentaux et *sham* pour les deux groupes contrôles. Puis, lors de la septième semaine, après nous être assuré que la neuropathie a bien été induite, nous procéderons à l'accouplement de deux femelles avec un mâle. Puis, à tous les jours à 7h00 AM, nous vérifierons si un bouchon vaginal est présent à l'entrée du vagin. Lorsqu'un bouchon sera observé, nous considérerons que la femelle est gestante. Puis, nous retirerons le mâle lorsque les deux femelles seront gestantes. Nous porterons une attention particulière à ne pas transférer l'odeur d'autres mâles que celui leur étant attribué.

### **3.3 Placenta**

Le placenta est un organe qui se développe lors d'une gestation. Il varie au niveau de sa présentation et de ses caractéristiques entre différentes espèces (Grigsby, 2016). On divise les placentas selon leur morphologie et selon l'aire des échanges fœto-maternels : Diffus (cheval, cochons), cotylédonaire (ruminant), zonaire (carnivores) et discoïde/bidiscoïde (primate, rongeur et lapins). Puis, ces catégories sont subdivisées selon les différences histologiques au niveau de l'interface maternelle et chorion : épithéliochorial (cheval, cochon et ruminants), endothéliochorial (carnivores) et hémochorial (rongeur, lapin, primate). Un placenta hémochorial signifie que la couche trophoblastique est en contact direct avec le sang maternel (Schmidt et al., 2015). Il n'y a donc pas de séparation par un épithélium ou un endothélium.





**Figure 8 :** Représentation visuelle des catégories placentaires de différentes espèces. (a) Placenta épithéliochorial caractérisé par une séparation entre le sang maternel et le chorion par un épithélium utérin (cellules bleues) et par un endothélium vasculaire maternel. (b) Placenta endothéliochorial caractérisé par une séparation du sang maternel et du chorion par un endothélium vasculaire maternel. (c) Placenta hémochorial où le sang maternel est en contact direct avec les villosités chorioniques. (Source : PrabhuDas et al., 2015)

On peut donc comprendre que les souris et les humains ont des placentas similaires, car les deux sont hémochoriaux. Cependant, plusieurs différences sont notables entre les placentas des souris et des humains (Schmidt et al., 2015). Ces deux espèces ont un placenta chorioallantoïque, mais la souris a en plus sac vitellin inversé. Cela signifie que pour les deux les structures chorioniques et allantoïques sont fusionnées autour du fœtus. Chez les rongeurs, le sac vitellin fusionne avec le chorion tôt dans la gestation ce qui forme ultérieurement le placenta. D'autres différences sont notables. Le placenta humain est monochorial alors que celui de la souris est trichorial. Chez l'humain, l'invasion trophoblastique se fait jusqu'au tiers interne du myomètre. Pourtant, chez la

souris, l'invasion trophoblastique se fait plus en profondeur. La souris reste donc, en comparaison avec d'autres espèces, un bon modèle de recherche.

Pour notre projet, la souris demeure le meilleur modèle de recherche en tenant en compte qu'elle a un placenta similaire au placenta humain, elle est peu coûteuse et permet un environnement de recherche facile à manipuler.

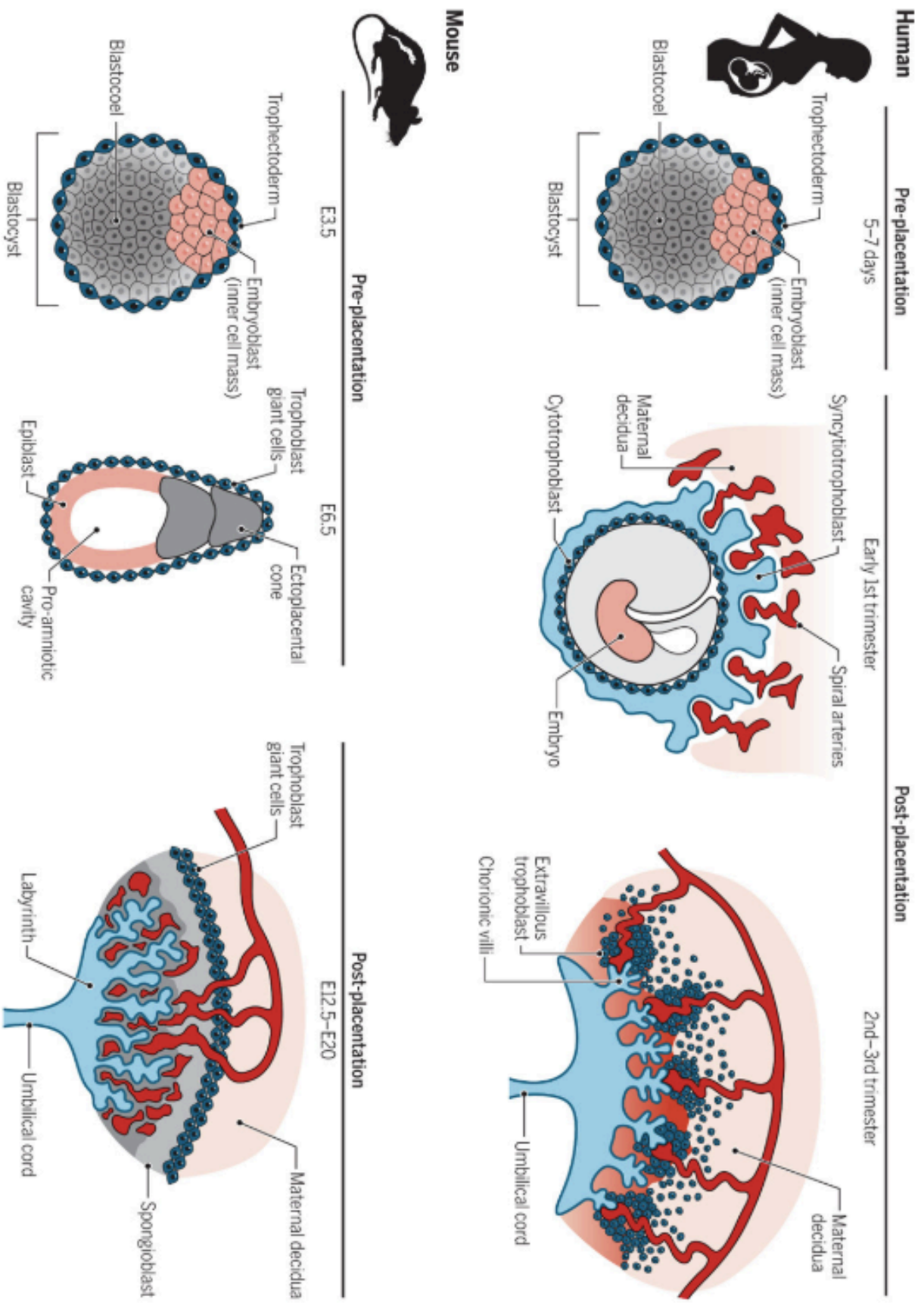


Figure 9 : *Placentations de l'humain et de la souris. Le blastocyste est composé des mêmes cellules, mais, suite à cette étape, certaines différences sont observées. Chez l'humain, suite à la troisième semaine de grossesse, le placenta est formé officiellement avec des arbres villex. Suite à ce stade, des trophoblastes extravilleux ancrent en place les villosités choriales à la décidua. Ces villosités choriales baignent directement dans le sang maternel afin d'effectuer des échanges de nutriments, de déchets et des gazes à travers la barrière placentaire. Chez la souris, suite au blastocyste, l'embryon en développement est encapsulé par des cellules trophoblastes géantes. Environ au dixième jour de gestation, le placenta est formé officiellement où des villosités pliées forment un labyrinthe perfusé de sang maternel afin d'effectuer les échanges nécessaires.* (Source : Ander et al., 2019)

### 3.3.1 Rôles du placenta

Le placenta dessert plusieurs rôles différents pour le fœtus et la mère : transport des nutriments, déchets et gazes, circulation sanguine entre la mère et le placenta, développement de l'arbre fœtal placentaire, la modulation endocrine du métabolisme maternel, le métabolisme placentaire et une barrière sélective (Burton et Fowden, 2015).

D'abord, il permet l'échange de nutriments vers le fœtus et ramène les déchets dans la circulation sanguine maternelle (Burton et Fowden, 2015). Ces échanges peuvent s'effectuer par diffusion, des mécanismes de transport médié ou par exocytose/endocytose. Les études effectuées sur le sujet suggèrent que les échanges sont effectués au niveau des membranes plasmiques basale et apicale. Le placenta est important afin d'établir une circulation entre mère et fœtus (Burton et Fowden, 2015). Cette circulation est permise par l'infiltration de trophoblastes dans les artères utérines maternelles.

La vasculogénèse fœtal commence avec la différenciation de groupes cellulaires hémangioblastiques dans le mésenchyme suite à la fertilisation (Burton et al., 2009). Ces groupes deviennent des bandes cellulaires juste en dessous de la membrane basale trophoblastique (Lash et al., 2010). Les bandes éventuellement forment un réseau de cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées (Leach et al., 2002). Puis, un lumen se forme dans lequel des cellules souches hématopoïétiques puis des érythrocytes passent. Ainsi, le placenta est responsable du développement de l'arbre vasculaire fœtal placentaire.

Le placenta est aussi responsable de la modulation endocrine du métabolisme maternel (Burton et Fowden, 2015). Le glucose est le substrat pour les métabolismes fœtal et maternel. Il passe à travers le placenta par diffusion facilitée. Ainsi, le gradient de concentration est important afin que le fœtus ait une concentration de glucose nécessaire. Aussi, dans le début de la grossesse, les hormones placentaires augmentent l'apport alimentaire et le stockage d'énergie alors qu'en fin de grossesse elles mobilisent les réserves pour le développement fœtal et pour la préparation à la lactation (Freemark, 2006 ; Newbern et Freemark, 2011). Les hormones en question sont les lactogènes placentaires et les hormones de croissance placentaires.

Le placenta doit aussi remplir ces propres demandes métaboliques (Burton et Fowden, 2015). Il consomme environ 40% de l'oxygène destiné à l'unité fœtale-placentaire (Carter, 2000).

En somme, le placenta remplit plusieurs différentes fonctions ce qui explique son importance dans un contexte de gestation.

### 3.3.2 Barrière fœto-placentaire

Une barrière entre mère et fœtus permet d'empêcher l'exposition du fœtus à certains composés dangereux (Burton et Fowden, 2015). En effet, le fœtus vit dans un microenvironnement afin qu'il

soit protégé de certaines hormones maternelles, des polluants environnementaux et de certains médicaments. Les syncytiotrophoblastes sont équipés d'enzymes et des transporteurs permettant de détoxifier, équivalant le rôle des cellules hépatiques. Une enzyme bien connue est 11- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase 2 (11- $\beta$ HSD2) qui oxyde le cortisol maternel pour le rendre inactif. Ainsi, le placenta prévient l'exposition du fœtus au stress maternel qui, lorsqu'il est injecté directement au fœtus, peut causer une réduction de prolifération cellulaire et un retard de croissance intra-utérin.

Cette barrière placentaire est aussi utile afin de transférer des composants nécessaires à la protection immunitaire du fœtus (Chucui et al., 2010). La barrière d'un placenta hémochorial entre fœtus et mère est composée de trois épaisseurs de tissus (Leiser et Kaufmann, 1994). Des cinq types d'anticorps que nous possédons, seule l'IgG est capable d'atteindre le fœtus (Kane et Acquah, 2009). Ce transfert commence approximativement vers la vingtième semaine de gestation et augmente par la suite (Saji et al., 1999 ; Simister, 2003).

### 3.3.3 Cytokines et système endocrinien

La famille des cytokines comprend les interleukines (IL), le facteur de nécrose tumorale (TNF), les chimiokines et les interférons (IFN). Certaines de ces molécules sont pro-inflammatoires et d'autres anti-inflammatoires (Beaulieu et al., 2010). Durant la gestation, certaines cytokines jouent un rôle dans la physiologie du placenta tel que la régulation des hormones placentaires. La production de la gonadotrophine chorionique est stimulée par l'interleukine 1 $\beta$  (Masuhiro et al., 1991; Seki et al., 1997; Yagel et al., 1989) et TNF $\alpha$  (Li et al., 1992). Les cytokines participent à la réponse immunitaire des tissus reproducteurs durant la gestation (Zdravkovic et al., 1997). Les interférons dérivés des cellules trophoblastiques et le TNF alpha interfèrent avec la réplication des

virus (Franco et al., 1999; Paradowska et al., 1996). Les cytokines jouent également un rôle dans la contractilité du myomètre, et différentes pathologies liées à la gestation telles que la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin (Bowen et al., 2002). Donc, tout déséquilibre des cytokines pourrait interférer dans la gestation. Les cytokines sont connues pour être augmentées lors de douleur neuropathique (Koch et al., 2007), mais leur rôle dans le développement du fœtus est inconnu pour cette pathologie.

Au niveau du système endocrinien, la douleur chronique est associée au stress qui stimule l'hypothalamus et la glande pituitaire qui secrètent des facteurs trophiques causant la relâche d'hormones des surrénales et des gonades (Griep et al., 1998; Moore et al., 1983; Neeck et al., 1990; Shenkin, 1964; Strittmatter et al., 2005). Il est reconnu qu'une douleur chronique sans soulagement cause l'élévation d'ACTH de la pituitaire, le cortisol ou corticostérone des surrénales et de la testostérone des gonades. Si le stress perdure, il y a une dépression significative de la production de ces hormones (Tennant, 2013; Griep et al., 1998; Neeck et al., 1990; Strittmatter et al., 2005). Ces modifications hormonales bloquent l'implantation des embryons (Horne et al., 2000). Des diminutions d'estrogènes, de progestérone et de testostérone affectent également les femmes gestantes (Vincent et Tracey, 2008). Des études récentes appuient la nécessité de l'exercice chez la femme gestante afin d'éviter les complications en rétablissant des niveaux normaux des hormones (Davenport et al., 2019).

## **4. LES SOURICEAUX**

Suite à la mise-bas, nous évaluerons les souriceaux afin de déceler des retards développementaux possibles. Nous pensons que les souriceaux de mères neuropathiques n'ayant pas eu accès à une roue d'exercice vivront des retards au niveau de leur développement. Dans l'étude de Zhou et al. (2018), les souriceaux de mères atteintes d'une douleur inflammatoire aigüe étaient nés prématurés, vivaient un retardement au niveau de leur neurodéveloppement (réflexe de redressement et de *crawling*), étaient moins pesants, vivaient plus de morts postnatales et étaient moins nombreux par portées. Afin d'évaluer cette hypothèse, nous effectuerons une batterie d'évaluations des souriceaux au niveau du développement normal moteur et neurologique des nouveau-nés.

### **4.1 Développement normal des souriceaux**

Selon les études de Fox (1965) et Lubics et al. (2005), différents réflexes peuvent être effectués pour évaluer le développement des rongeurs : préhension plantaire et palmaire, recouvrement, géotaxie négative, rampement, ouverture des yeux et plusieurs autres.

Lors de la naissance, aucune évaluation ne peut être faite, car les souriceaux sont encore trop immatures au point de vue de leur développement cérébral (Nguyen et al., 2017). Donc, nous avons décidé de peser les souriceaux et de les mesurer en longueur. Par la suite, vers la troisième journée suite à la naissance, certains réflexes peuvent être observés dont le recouvrement, le réflexe de *rooting*, la géotaxie négative, la préhension palmaire et le rampement (Glynn et al., 2007 ; Zhou et al., 2018). Puis, vers la sixième journée postpartum, les souriceaux développent la capacité de marcher sur de plus longues distances (Glynn et al., 2007).



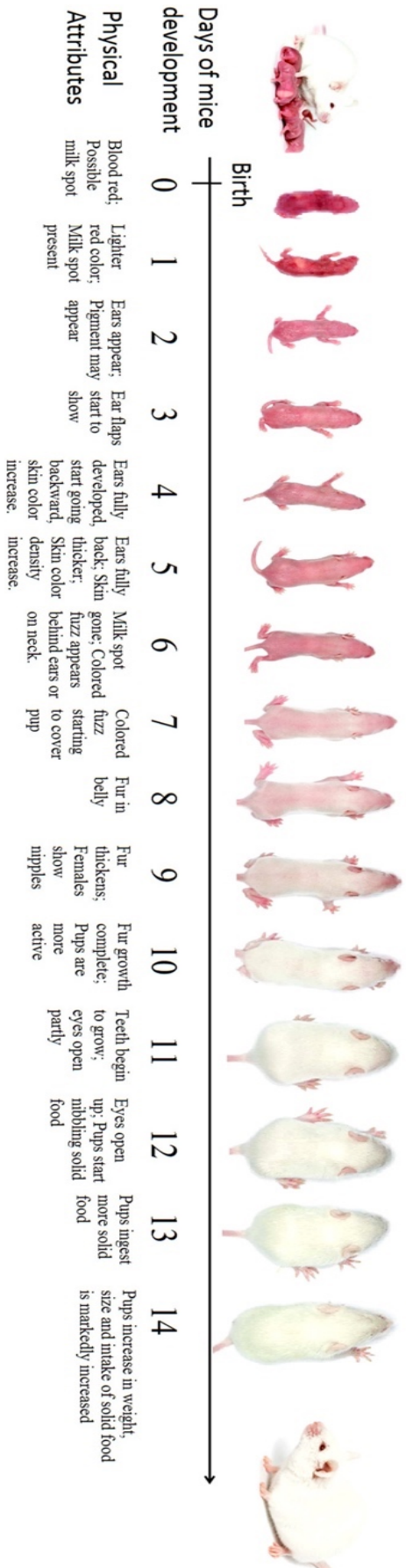


Figure 10 : *Représentation de l'évolution des souriceaux. À la naissance, leur peau a une couleur rouge vif. À la troisième journée, les oreilles commencent à apparaître. À la cinquième journée, les oreilles sont complètement développées. À la sixième journée, le pelage commence à paraître. À la dixième journée, le pelage est complet. À la douzième journée, les yeux sont ouverts. Finalement, à la treizième journée, ils commencent à manger de la nourriture solide et gagneront ainsi progressivement du poids. (Source : Dutta et Sengupta, 2016)*

## **4.2 Tests post-naissance**

Les évaluations qui seront effectuées sur les souriceaux sont supportées par la littérature (Glynn et al., 2007 ; Nguyen et al., 2007). Les tests sont décrits ci-dessous. Suite à la naissance des souriceaux, différents tests seront faits afin d'évaluer leur développement. Le jour de leur naissance, ils seront pesés et mesurés en longueur de la tête au début de la queue en utilisant un pied à coulisse. Puis, le troisième jour postpartum, nous effectuerons des tests de neurodéveloppement, soit la géotaxie négative, le recouvrement, le *rooting*, la préhension et le rampement. Au sixième jour postpartum, nous ferons un autre test de rampement. Tous ces tests comportementaux évaluent la motricité fine des souriceaux et sont extrêmement complexes au niveau du contrôle nerveux, impliquant plusieurs régions corticales et différences circuits nerveux. Par exemple, la préhension palmaire requiert plusieurs centres nerveux afin d'être effectuée. Ces évaluations reflètent donc une maturité développementale.

### **4.2.1 Géotaxie négative**

Sur une surface plane à un angle de  $45^\circ$ , le souriceau sera placé à la déclive, soit la tête vers le bas. Il aura complété le test s'il est retourné à  $180^\circ$  (face vers le haut) et ceci à l'intérieur d'un maximum

15 sec. Une semi-complétion et une non-complétion, est considéré une rotation d'au moins 90° et de moins de 90° respectivement.

#### 4.2.2 Recouvrement

Le souriceau sera placé en position dorsale dans une cage tapissée de matériaux de nidation. Un souriceau complétant cette épreuve doit se retourner en position ventrale avec toutes ses pattes (debout) en au moins 15 sec. Une semi-complétion est représentée par une position ventrale avec certaines pattes n'étant pas debout. Une non-complétion était décrite comme une position ventrale inachevée.

#### 4.2.3 Rooting

Ce réflexe a été mesuré en frottant le côté du visage d'un souriceau avec un cure-dent. Le souriceau réussira s'il tourne la tête vers le côté précédemment effleuré.

#### 4.2.4 Préhension

La préhension avec les membres antérieurs est évaluée en plaçant un cure-dent dans la paume des pattes. L'évaluation est complète si la patte se referme sur le cure-dent.

#### 4.2.5 Rampement

Au troisième jour postpartum, le rampement sera évalué en plaçant les souriceaux sur une surface plane au milieu d'un cercle de 5 cm. Pour chaque évaluation, les souriceaux seront évalués par groupe de cinq à fois, et enregistrés avec une caméra vidéo. Un temps maximal de 60 secondes leur sera alloué afin de compléter la tâche, qui consiste à ramper vers l'extérieur du cercle. Les

résultats seront analysés en déterminant le nombre ayant complété la tâche en touchant la ligne du cercle avec leur sacrum.

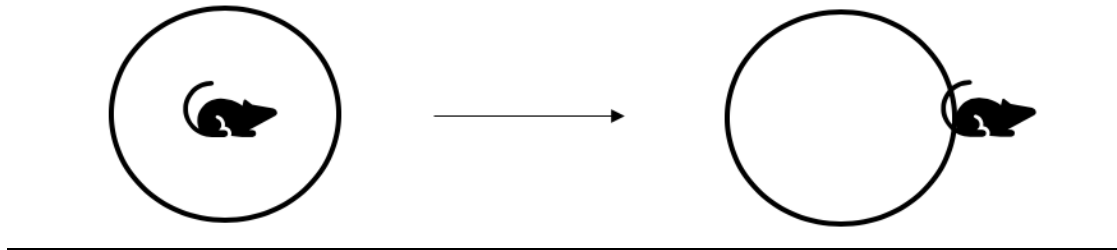


Figure 11 : *Illustration représentant la complétion de la tâche de rampement au troisième jour postpartum.*

Un deuxième test de rampement sera effectué le sixième jour postpartum, cette fois-ci avec un radius de 20 cm, toujours avec des enregistrements vidéo. Un temps maximal de deux minutes sera alloué pour compléter le test. Ceux n'ayant pas complété la tâche recevront un temps de deux minutes.

Pour les évaluations de rampement, les moyennes seront calculées par portées, puis par groupes.

Les études de Zhou F et al. (2018) ont démontré que les souriceaux de mères atteintes de douleur inflammatoire aigüe ont vécu un retard de développement comparativement aux souriceaux normaux. En effet, ces portées sont nées de manière prématurée, avec moins de souriceaux et avec des poids inférieurs comparativement aux contrôles. Aussi, ce groupe avait un taux inférieur de naissances vivantes. Relativement aux réflexes, ces souriceaux ont vécu un taux inférieur de succès aux réflexes de recouvrement et de *crawling*. Cependant, les souriceaux de mères atteintes de douleur inflammatoire sévère ayant eu un environnement enrichi n'ont vécu aucun des effets

néfastes cités ci-dessus. Ainsi, l'enrichissement de l'environnement a permis de renverser ces effets.

## **CONCLUSION**

En somme, ce projet cherche à étudier la gestation en contexte de douleur chronique neuropathique et à étudier l'impact de l'ajout d'une roue d'exercice dans ce contexte. Cette étude est nécessaire afin de recueillir les premières données de l'impact de douleur chronique sur la gestation. En effet, aucune autre étude n'a encore examiné la question. Aussi, l'utilisation d'une roue d'exercice permettra d'évaluer scientifiquement si l'activité physique permet de réduire la douleur en contexte de gestation. La souris sera notre modèle animal, car son placenta a plusieurs similitudes avec le placenta humain et que sa taille permet de larges cohortes dans un petit espace. Finalement, les souriceaux de chaque groupe seront évalués afin de déceler des différences au niveau de leur développement.

## **OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES**

L'étude de Zhou et al. (2018) suggère qu'une douleur chronique aura un impact négatif sur le développement des souriceaux, et que le tout est renversé par un enrichissement de l'environnement. Par contre ils ont utilisé un modèle inflammatoire sévère chez des souris atteintes de problèmes reproducteurs. Pour notre étude, nous utiliserons un modèle reconnu de douleur chronique qui induit beaucoup moins d'inflammation. Nous avons également choisi de faire notre étude avec des souris couramment utilisées en recherche, la souris CD-1, qui est une excellente reproductrice qui s'occupe particulièrement bien de ces nouveau-nés.

Avec ces considérations, nous émettons les objectifs suivants :

1. Évaluer le développement des souriceaux dans le contexte d'une douleur neuropathique chronique des mères CD1.
2. Évaluer si l'enrichissement de l'environnement permet de diminuer ces effets en diminuant la douleur chez les mères gestantes.

Face à ces objectifs, nous émettons les hypothèses suivantes :

1. Une douleur neuropathique chronique induite par un modèle classique aura un impact négatif sur le développement et les caractéristiques physiques des souriceaux de souris CD-1.
2. Une augmentation de l'exercice durant la gestation, diminuera la douleur chronique des mères et améliorera l'issue des portées souffrant de cette condition.

# **The Effects of Exercise on Pain and Reproductive Performance in Female Pregnant Mice with Neuropathic Pain**

Madeleine Parent-Vachon, BSc.Inf.Sci., RN<sup>2</sup>, Francis Beaudry, PhD<sup>2</sup>, Denise Carrier, TSA, MLAT<sup>1</sup>, Graziella Di Cristo, PhD<sup>1</sup>, Pascal Vachon, PhD, DVM, DACLAM<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ste-Justine Children's Hospital Research Center, University of Montreal, Montreal, Canada.

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Biomedicine, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

Emails

MPV: [madeleine.parent-vachon@umontreal.ca](mailto:madeleine.parent-vachon@umontreal.ca)

FR: [francis.beaudry@umontreal.ca](mailto:francis.beaudry@umontreal.ca)

DC: [denise.carrier@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:denise.carrier@recherche-ste-justine.qc.ca)

GdC: [graziella.di.cristo@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:graziella.di.cristo@recherche-ste-justine.qc.ca)

PV: [pascal.vachon@umontreal.ca](mailto:pascal.vachon@umontreal.ca)

**Corresponding author:** P. Vachon, Department of Veterinary Medicine Biomedicine, Faculty of Veterinary Medicine, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe Qc, Canada J2S 2M2

Email: [pascal.vachon@umontreal.ca](mailto:pascal.vachon@umontreal.ca)

**Running title:** Exercise, pain and reproductive performance

**Acknowledgments:** This study was supported by the Fond de Développement pour la Médecine des Animaux de Laboratoire (P. Vachon). The mass spectrometry analyses were performed using an infrastructure and operation funded by the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the *Fonds de Recherche du Québec (FRQ)*, Government of Quebec (F. Beaudry CFI John R. Evans Leaders grant no. 36706). We want to acknowledge Guy Beauchamp (Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal) for statistical analyses on all results (except the peptide results) as well as Marie-Thérèse Parent for the preparation of the figures.

## **Declaration of Conflicts of Interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.



## **Abstract**

Pain can have negative physiological and psychological impacts on pregnancy. Pregnant women are fearful of using pain medication because of teratogenic effects. In this study we evaluated whether exercise could lower pain sensitivity in pregnant mice with neuropathic pain and reduce the negative effects of maternal pain on newborns. We randomly assigned 32 female mice to one of four groups (8 mice/group): Sham surgery with standard (SE) or enriched environment (EE) or spare nerve injury (SNI) with SE or EE. Mice in EE groups had access to an exercise wheel. Mothers were evaluated for mechanical sensitivity with Von Frey filaments and for exercise performance with computerized running wheels. Mice were impregnated 2 weeks after the initiation of EE. Pups were weighed and measured for length at birth and evaluated for negative geotaxis, righting, forelimb grasping, rooting and crawling at 3 days postpartum and for crawling at 6 days postpartum. Following euthanasia, mothers' frontal cortexes were analyzed for selected neuropeptides. After exercise exposure, only SNI-SE females remained neuropathic. Exercise levels were similar between EE groups. Some brain neuropeptides (endorphins, enkephalins and oxytocin) from SNI females showed significant differences with exercise. Number of pups was significantly smaller in the SNI-SE group. Significantly more pups died at birth in the SNI-SE group, but pup behavior tests (except righting) were similar across groups. Exercise can reduce neuropathic pain in pregnant mice. Neuropathic pain does not impact motor neurodevelopment of mice pups but does appear to affect litter size and neonatal mortality.

## **Key words**

Neuropathic pain, gestation, environmental enrichment, spared nerve injury, exercise, mice

In the general population, approximately 20% of women (Meana et al., 2004) and 10% of individuals under the age of 60 years (Crook et al., 1984) experience chronic pain. During pregnancy, women suffering from pain are fearful of using pain medications because of teratogenic effects (Nordeng et al., 2010). However, untreated chronic pain can lead to physiological changes such as the development of hypertension and psychological changes such as the development of anxiety and depression, all of which can negatively impact pregnancy (Bruehl et al., 2005). Use of pain medication can also lead to clinical problems. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs can prematurely close the fetal ductus arteriosus (Koren et al., 2006). Regular use of opioids can lead to neonatal withdrawal syndrome, and opioids can enter the mother's milk (Briggs et al., 2002). Even with small doses of codeine, there is a risk of neonatal abstinence syndrome (Khan & Chang, 1997; Reynolds et al., 2007). Thus, a nonpharmacological approach for chronic pain management might improve maternal and fetal outcomes.

Environmental enrichment (EE) has become more widely recognized as a means to alleviate chronic pain (Tai et al., 2018). Exercise is an accessible intervention nurses can propose to patients (Pearce et al., 2013). It is also a recommended behavior during pregnancy in general to improve outcomes (Davenport et al., 2019). It thus makes sense to explore the role of exercise during pregnancy in women with chronic pain.

EE reduced neuropathic pain by increasing the mechanical-sensitivity threshold in sensitized mice (Vachon et al., 2013) and rats (Parent-Vachon & Vachon, 2018). In CD-1 mice, demethylated DNA in the prefrontal cortex, which was associated with neuropathic pain, was reduced with EE (Tajerian et al., 2013). EE reduces allodynia and hyperalgesia and is associated with reductions in the levels of biomarkers of central pain sensitivity (Grace et al., 2016; Ye et al., 2017). EE is often composed of many different elements including social and psychological

elements, as well as object novelty, nutrition and exercise. Exercise alone can induce analgesia by modulating inflammatory cytokines and by causing the release of endogenous opioids in the central and peripheral nervous systems (Kami et al., 2016, 2017). Exercise can also induce pain in the contexts of a musculoskeletal condition or sedentary lifestyle (Lima et al., 2017). However, performing regular exercise typically induces analgesia through activation of endogenous opioids and serotonin (Sluka et al., 2018). EE, and more specifically, exercise, might therefore be an effective alternative to pharmacological treatments of chronic pain.

Neuropathic pain is a type of chronic pain described as a lesion or dysfunction of the peripheral or central nervous system that causes an increase in the sensitivity of neurons (Mumion, 2018). There is only one published paper on the effects of neuropathic pain during gestation in mice (Rosen et al., 2017). In that study, researchers performed spare nerve injury (SNI) surgery in early gestation, late gestation and post weaning, which thus did not allow for exploration of the effects of a neuropathic pain condition prior to conception. In another study, authors described the effects of chronic inflammatory pain prior to gestation (Zhou et al., 2018). In that study, researchers created a model of chronic inflammation with hyperalgesia by injecting complete Freund's adjuvant (CFA) in the mouse hind paw prior to conception. In CFA-treated mothers, researchers observed a higher rate of prematurity, smaller litter size, lower rate of live birth, lower birth weights and lower success rate in the pups of crawling and the righting reflex. With EE, the pain thresholds of the mothers were increased and all of the negative outcomes were improved. However, the EE comprised a number of different elements including a house-shaped hole, ladders, sliding rope, soft wood for biting as well as peanuts and sunflower seeds. The two food elements contain anti-inflammatory constituents as well as antioxidants, which may have contributed to the reduction in chronic inflammation and hyperalgesia following CFA injections.

Though these findings are interesting, neuropathy is a much more common cause of moderate-to-severe inflammatory pain and hyperalgesia in women.

The objectives of the present study, therefore, were to use a well-recognized model of neuropathic pain in mice (SNI) to evaluate whether exercise can lower pain sensitivity in female mice with chronic neuropathic pain before and during pregnancy, improve the reproductive performance of these mothers, and diminish the negative effects of maternal neuropathic pain on newborns.

## **Methods**

### **Animals and Environmental Conditions**

We used 32 8-week-old female and 16 male CD-1 mice for these experiments (Specific Pathogen Free [SPF] grade, Charles River Laboratories, Kingston, NY, USA). We selected CD-1 mice because of their reproductive proficiency and good maternal behavior (Giknis & Clifford, 2007). Upon their arrival, we kept mice in a standard animal-facility environment (fresh filtered air, temperature  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , humidity 40–60% and light–dark cycle 12:12 hr). . Water and a rodent diet (Teklad 2018, global protein diet, Envigo, USA) were provided ad libitum. Mice were housed two per ventilated polycarbonate cage (Sealsafe Plus GM500, Tecniplast, Inc., Varese, VA, USA).

We randomly assigned female mice to one of four groups (8 mice/group): 1) Sham surgery with standard environment (sham SE), 2) sham surgery with enriched environment (sham EE), 3) spare nerve injury surgery with standard environment (SNI-SE), and 4) spare nerve injury surgery with enriched environment (SNI-EE). Male mice arrived 1 week prior to mating for acclimation. All females were provided with nesting material (Nestlet, Ancare, Bellemore, NY, USA). Mice in the standard environment were provided with a mouse igloo (Mouse House, Tecniplast, Inc.), while the mice with an enriched environment also had access to an exercise wheel (Fast-Trac

activity wheel, BioServ, Flemmington, NJ, USA) starting from the second week following the surgery. Previous studies found these wireless running wheels to be effective to evaluate running performance (Sanchez-Roige et al., 2014). The Animal Ethics Research Committee of the Sainte-Justine University Hospital Research Center approved the protocol.

## **Research Protocol**

Figure 1 presents the study time line.

- Week 1: Following their arrival, female mice were acclimated to the facilities.
- Week 2: We took weights for female mice and assessed their mechanical sensitivity using von Frey filaments.
- Week 3: Female mice underwent surgery on the left leg under isoflurane anesthesia to produce a spare nerve injury (SNI) model (sham surgery as control) according to previous published methods (Decosterd & Woolf, 2000). Briefly, the tibial and common peroneal nerves were tied with 6-0 suture and cut; the sural nerve was left intact. For sham surgery, the nerves were visualized but not cut. Subcutaneous ampicillin 25 mg/kg (Ampicillin 250 mg, Pfizer, Lake Forest, IL, USA) was administered immediately following the surgery. The mice were then returned to their home cages.
- Week 5: We weighed female mice and assessed their mechanical sensitivity with von Frey filaments. Fast-Trac activity wheels were introduced following the von Frey assessments and remained in the cages of the EE mice for the duration of the study except for during the computerized running performance evaluations. Running wheels were removed approximately 3 days prior to parturition.
- Week 6: Exercise was quantified over a 24-hr period by replacing the Fast-Trac activity wheel with a low-profile running wheel (Med Associates, Inc., St-Albans, VT, USA). The

wheel recorded the number of wheel turns per 24 hr. We divided that number by 2 to estimate the activity of each of the two mice per cage.

- Week 7: All the females were mated with male CD-1 mice with a ratio of one male for two females. Both females were introduced into the male's cage. Female mice were assessed every day for the presence of a vaginal plug. If a vaginal plug was present, it was considered a sign of successful copulation and was defined as Day 0 of gestation. When both females had been copulated (all within 5 days), they were removed from the male's cage and placed singly into new cages. The female mice were weighed 10 days later to establish the presence of gestation.
- Week 8: Female were weighed and locomotor activity was assessed with the low-profile running wheels.
- At birth: Pups were weighed and length was measured.
- Day 3, post-delivery: Pups were assessed for motor neurodevelopment, including negative geotaxis, righting, forelimb grasping, and rooting.
- Day 6, post-delivery: Pups were assessed for crawling.

### **Evaluations of Female Mice**

To assess mechanical sensitivity in the female mice we followed previously published methods using von Frey filaments (Vachon et al., 2013). We used the lateral plantar surface of both hind paws and calculated a 50% threshold to withdraw (g), as previously described (Chaplan et al., 1994). Prior to testing, mice were acclimated to the setup for 60 min. We applied calibrated von Frey filaments (Stoelting Co., Wood Dale, IL) to the point of bending for 4 s or until withdrawal. The stimulus intensity ranged from 0.02 to 2.0 g, corresponding to filament numbers 2.36 – 4.31. We applied an up–down method to determine the threshold of mechanical sensitivity.

Total gestation length was calculated from the date of the first presence of the vaginal plug to the birth of pups. The number of live and dead pups was noted on Days 0 and 3 post delivery.

Following all evaluations, we euthanized females with CO<sub>2</sub>, rapidly collected their cerebral hemispheres and placed them on dry ice, and then stored them at -80°C pending mass spectrometry analysis of peptides.

### **Pup Evaluations**

We weighed the pups at birth and measured them from rostral nose to the beginning of the tail using a Vernier calliper. On Day 3 post delivery, we assessed the motor neurodevelopment of the pups by testing negative geotaxis, righting, forelimb grasping, rooting and crawling (Glynn et al., 2007; Nguyen et al., 2007).

We tested for negative geotaxis by placing pups face down on a flat, smooth, plastic surface at an angle of 45°. Pups successfully completed the test if they rolled 180° (face up) within 15 s. We recorded a semi-completion and a noncompletion as rotations of at least 90° and less than 90°, respectively.

We assessed righting ability by placing the pup in a supine position with all four paws pointing up. Pups successfully completed the test when they assumed a ventral position with all four limbs upright in a standing position within 15 s. We recorded a semi-completion when pups achieved a ventral position but with some limbs not upright and a noncompletion when pups failed to achieve a ventral position.

We assessed forelimb grasping ability by placing a toothpick in the middle of the paws of the pup. Successful completion of the task was achieved when pups grasped the toothpick. We measured rooting by stroking a toothpick on the side of the face of a pup. The pup completed the test successfully if it turned its head to the side being stroked.

We assessed crawling by placing the pup on a flat surface in the middle of a circle 5 cm in diameter. The pup completed the task successfully if it reached the distal limit of the circle in less than 30 s.

On Day 6 post-delivery, we again assessed the pups for crawling by putting them in the center of a circle 20 cm in diameter in a cage with soft wood bedding. Each pup had a maximal time of 2 min to reach the distal limit of the circle. For pups who did not complete the task in 2 min, we recorded a time of 2 min. For crawling evaluations on days 3 and 6 both a qualitative (success) and a quantitative (time to perform the task) were recorded.

We filmed all crawling evaluations (using Logitech Webcam C210, Logitech, Newark, CA, USA). A single experienced evaluator blinded to group assessed all videos. We performed all behavioral tests in pups and mothers in a quiet, dimly lit room.

### **Evaluation of Brain Peptides**

We weight frontal brains (rostral third) of female mice (from Sham ES, SNI-SE, and SNI-EE) and aliquoted them to reinforced 1.5 mL homogenizer tubes containing 500  $\mu$ m glass beads. We chose selected brain peptides from our previous pain studies (Ferland et al., 2011; Pailleux et al., 2013). A solution of 0.25%TFA was added at a ratio of 1:5 (w:v) and a Fisher Bead Mill was used at 5 m/s for 3 x 60 s to homogenize the sample. The homogenates were centrifuged at 12,000 g for 10 min. The protein concentration for each homogenate was determined using a Bradford assay, and all samples were normalized to avoid any bias. To precipitate large and medium proteins, 100  $\mu$ L of sample was mixed with 100  $\mu$ L of methanol containing 0.1% TFA. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min. The supernatant was dried using an Eppendorf vacuum concentrator, resuspended in 50  $\mu$ L of 5% acetonitrile in water containing 0.1% formic acid and transferred into low-volume high-performance liquid chromatography (HPLC) vials. The HPLC



system was a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system (San Jose, CA, USA). The chromatography was performed using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C18 100 × 1 mm, with a particle size of 5 µm. The initial mobile-phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 2 min, the ratio was maintained at 5:95. From 2 to 62 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 50:50 and maintained for 3 min. The mobile-phase composition ratio was reverted to the initial conditions, and the column was allowed to equilibrate for 20 min for a total run time of 85 min. The flow rate was fixed at 50 µL/min, and 5 µL of sample was injected. A Thermo Scientific Q-Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer (MS) (San Jose, CA, USA) was interfaced with a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system using a pneumatically assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in positive-ion mode using the TOP-10 data-dependent acquisition (DDA) method. Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases, which were set at 10 and 5 arbitrary units, respectively. Auxiliary gas was heated to 200°C. The heated electrospray ionization (ESI) probe was set to 4000 V and the temperature of the ion-transfer tube was set to 300°C. The scan range was set to  $m/z$  400–1500. Data were acquired at a resolving power of 70,000 (full width at half maximum [FWHM]) using an automatic gain control target of  $1.0 \times 10^6$  and maximum ion injection time of 200 ms. Product ion spectra ( $MS^2$ ) were acquired at a resolving power of 17,500 (FWHM) using an automatic gain control target of  $1.0 \times 10^5$ , maximum ion injection time of 50 ms and an intensity threshold of  $5.0 \times 10^4$ . The normalized collision energy was set to 28 (higher-energy C-trap dissociation [HCD]), and the isolation window was set to 2 Da. Peptide identification and quantification were performed using Proteome Discoverer 2.2 with a customized FASTA database including only specific neuropeptide sequences. Targeted peptide quantification was performed at  $MS^1$  level using specific precursor masses based on the

monoisotopic masses. Peptide identification was performed by extracting specific precursor ions using a 5-ppm-mass window and a label-free approach. The data were normalized based on the peak areas observed of the mean of the sham group for relative quantification. Instrument calibration was performed prior to all analyses, and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. Peptide sequences were verified based on typical b and y fragments observed at the MS<sup>2</sup> level.

### **Statistical Analyses**

Statistical analyses were performed and graphs created using GraphPad Prism 4.0. We used one-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures to compare mechanical sensitivity and body weight of females among groups. If we found significant differences, we then performed comparisons between the group means using the sequential Benjamini-Hochberg method. We also used a one-way ANOVA compare time of gestation, numbers of pups per group and crawling (3 and 6 days post-delivery) among groups. If we found significant differences, we performed post-hoc Tukey tests. For all qualitative tests (geotaxis, grasping, rooting, righting, and crawling at 3 days), we used a Chi-square analysis. If we found significant differences between groups, we calculated odds ratios. We analyzed 24-hr wheel-turn count using Student's t-test. We express and plotted all data as mean  $\pm$  SEM and considered  $p < 0.05$  to indicate statistical significance.

Neuropeptide data were analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (Sham served as the control group). We set significance a priori to  $p < 0.05$ . These statistical analyses were performed using PRISM (version 8.0).

## Results

### Maternal Measures

Figure 2 presents the results of the von Frey filament mechanical sensitivity testing of the female mice. At baseline (pre-surgery), we observed no significant differences between groups. As expected, 2 weeks following surgery, there were significant differences between groups ( $F_{(3, 28)} = 40.30, p < 0.0001$ ). Comparisons using the Benjamini-Hochberg method showed that mice in the SNI group a significantly increased hypersensitivity to mechanical stimuli compared to those in the sham group ( $p < 0.0001$ ). Following exercise exposure (1-week post delivery), the SNI-SE animals differed significantly on the von Frey tests compared to the other groups ( $p < 0.0001$ ), while the SNI-EE animals did not differ significantly from the sham groups on these tests. Running performance did not differ significantly among groups either prior to or during gestation (Figure 3). Weights of mothers didn't did not vary differ among groups throughout the experiment.

Peptides analysis in the frontal cortex of female mice (Figure 4) showed a significant increase for met-enkephalin ( $p < 0.05$ ), leu-enkephalin ( $p < 0.05$ ), and beta-endorphins ( $p < 0.001$ ) in the SNI-EE group compared to the sham groups. There was a significant increase of oxytocin in the SNI-SE group compared to the sham group ( $p < 0.05$ ), with levels of oxytocin in the SNI-EE group similar to those of the sham groups. We found non-significant differences between the SNI and sham groups for other peptides (dynorphin A, neurokinin A, substance P, calcitonin-gene-related peptides [CGRP] 1 and 2) and not for others.

### Gestation Duration and Assessments of Pups at Birth and on Days 3 and 6

The duration of gestation was differed significantly among the groups (Table 1;  $F_{(3, 28)} = 5.24, p = 0.0054$ ). The post-hoc Tukey test revealed that the only significant difference in

gestational duration was between sham EE and sham SE groups ( $p < 0.01$ ). All gestational durations were within normal expected values.

The number of pups per group differed significantly among groups (Table 1;  $F_{(3, 28)} = 3.58$ ,  $p = 0.023$ ). The post-hoc Tukey test revealed that the number of pups in the SNI-SE group was significantly smaller ( $p < 0.05$ ) than that in all other groups. There was a significantly higher rate of deaths at birth in the SNI-SE group ( $n = 6$ ) because no deaths occurred in the other experimental groups. We observed no physical anomalies in pups in any of the groups.

At birth (Day 0), the weight ( $F_{(3, 27)} = 1.30$ ,  $p = 0.29$ ) and length ( $F_{(3, 27)} = 0.85$ ,  $p = 0.48$ ) of the pups did not differ statistically among the groups.

Table 2 presents the results of the behavioral tests we performed on the pups. On Day 3 post-delivery, we found no significant differences among groups for negative geotaxis ( $\chi^2 = 2.6276$ ,  $p = 0.45$ ), grasping ( $\chi^2 = 6.4535$ ,  $p = 0.092$ ), rooting ( $\chi^2 = 5.9601$ ,  $p = 0.11$ ), or crawling (Table 2,  $\chi^2 = 1.7338$ ,  $p = 0.63$ ). Also, no significant difference was found in the time allowed for crawling between groups ( $F_{(3, 27)} = 0.44$ ,  $p = 0.73$ ). However, the righting reflex differed significantly in the pups from mothers in the SNI-SE group compared to all other groups ( $\chi^2 = 13.4131$ ,  $p = 0.0038$ ). Odds ratio calculation demonstrated that the chances of observing righting was significantly higher in the SNI-EE group compared to the SNI-SE group by a factor of 3.2. Crawling times also did not differ significantly among groups on Day 6 ( $F_{(3, 27)} = 1.74$ ,  $p = 0.18$ ).

## Discussion

Results of the present study show that exercise with the running wheel significantly alleviated chronic pain induced by SNI surgery in female pregnant mice. Animals that underwent sham surgery showed no significant changes in mechanical sensitivity regardless of exercise condition. Following delivery, females in the SNI-SE group still demonstrated significantly

increased pain compared to baseline and the sham groups, whereas females in the SNI-EE group demonstrated no significant difference from baseline or the sham groups. These results suggest that exercise could alleviate chronic neuropathic pain during pregnancy. Importantly, exercise performance did not vary between the sham and SNI females, although the level of exercise, measured by the number of wheel turns per/hr over 24 hr, decreased for all groups during pregnancy, which was expected (Eclarinal et al., 2016). The duration of gestation varied significantly only between the two sham, with females in the sham EE group having a mean length of gestation that was 1 day longer than that of the sham SE group. All gestation durations were within the normal range for mice. Weights of mothers did not differ among groups throughout the experiment. These results clearly differ from those of a previous study (Zhou et al., 2018), where pain induced by an inflammatory model of injecting complete Freund adjuvant (CFA) in the posterior hind paw of mice was associated with shorter gestation periods and decreased weight in the mothers. These changes could be attributed to the severity of the model since the CFA injections caused significant swelling and pain for up to 28 days (Zhou et al., 2018), as compared to the standard CFA protocol, which, in previous studies, caused inflammatory swelling that is maximal at 24 hr and persists up to 7 days (Iadarola et al., 1988; Stein et al., 1988). The SNI model, apart from a partial motor paralysis, does not cause any significant swelling in the hind paws over time.

Results also show that live pups were similar in many aspects across groups. At birth, they did not differ in weight or length among groups and presented no gross physical anomalies. However, the number of pups was significantly less for the SNI-SE group. There were also mortalities following delivery in this group, while there were none for any of the other groups. These results differ somewhat from those of a previous study (Zhou et al., 2018), where pups were

shorter in length and weighed less at birth in the group that received CFA. These results suggest that the implantation and/or development of embryos is altered with chronic or inflammatory pain and that exercise can reverse this.

Behavioral tests in pups (geotaxis, righting, rooting, grasping, and crawling) at 3 and 6 days post birth showed no significant differences among groups except for the righting reflex, where a significantly smaller proportion of pups in the SNI-SE group were able to perform the test correctly compared to the other groups. We have no explanation at the present time to explain why we found a significant difference for the righting test only. These results differ from the results of Zhou et al. (2018), who concluded that pups showed a deficit in motor development following CFA injection in mothers who were provided with no environmental enrichment. In the present study, we performed a more extensive battery of tests and found that the pups were much less affected by the neuropathic pain of their pregnant mothers than we expected. Importantly, both the present study and Zhou et al. (2018) tested only motor behaviors and did not evaluate cognitive development at all. Future studies should longitudinally examine brain development and cognitive abilities in adulthood in order to explore possible effects on pups later in life of neuropathic or chronic pain in mothers during pregnancy.

We suggest that cytokines and the endocrine system explain our findings in the present study regarding the reproductive effects of neuropathic pain and exercise on reproduction. We further suggest that central nervous system modifications explain our findings regarding the ability of exercise to alleviate neuropathic pain in pregnant female mice.

Cytokines comprise interleukins (ILs), tumor necrosis factor (TNF), chemokines and interferons (IFNs). Some are pro-inflammatory, others anti-inflammatory (Beaulieu et al., 2010). During gestation, a number of cytokines play a key role in normal placental physiology such as

the regulation of placental hormones. Production of chorionic gonadotropin is stimulated by IL-1 $\beta$  (Masuhiro et al., 1991; Seki et al., 1997; Yagel et al., 1989) and TNF $\alpha$  (Li et al., 1992). Cytokines also participate in the reproductive tissue immune response during gestation (Zdravkovic et al., 1997). IFNs derived from the trophoblasts and TNF $\alpha$  can interfere with viral replication (Franco et al., 1999; Paradowska et al., 1996). Cytokines also play a role in myometrial contractility, amniotic membrane rupture and different gestational pathologies such as preeclampsia and intrauterine growth retardation (Bowen et al., 2002). Cytokines can also have deleterious effects on the fetus when they cross the placenta. Following a maternal infection, elevation of cytokines and chemokines can cause neurodevelopmental damage in the fetus, such as cerebral paralysis (Yoon et al., 1990 & 2000). However, the contributions of the viral agent and the immune response are not clear. With neuropathic pain, cytokine levels correlate with pain intensity (Koch et al., 2007). We suggest that the SNI model caused inflammation only at the beginning of gestation, which could be related to the decrease in the number of live pups in the SNI-SE group and, because exercise decreases inflammation (Beavers et al., 2010) it could also explain the normal reproductive performance of SNI-EE mice.

The endocrine system could also be involved in processes that would explain our reproductive findings (Tennant, 2013). Chronic pain is associated with stress, which stimulates the hypothalamus and pituitary glands, which, in turn, secrete trophic factors that cause the release of adrenal and gonadal hormones (Griep et al., 1998; Moore et al., 1983; Neeck et al., 1990; Strittmatter et al., 2005). Chronic pain, without immediate relief, may cause elevated serum levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) from the pituitary, cortisol from the adrenals, and testosterone from the gonad glands. If no relief is provided for an extended period of time, various hormones may become depleted (Griep et al., 1998; Neeck et al., 1990; Strittmatter et al., 2005;

Tennant, 2013). Serum levels of ACTH from the pituitary, pregnenolone from the adrenals, and progesterone from the gonads may decrease. These hormonal changes can impede embryo implantation (Horne et al., 2000). Decreased levels of estrogen, progesterone and testosterone may also affect the mothers (Vincent & Tracey, 2008). In adults, estrogen is associated with the availability of opioid receptors and a decrease in anxiety and stress, progesterone with analgesia and sedation, and testosterone with analgesia and stress. All these factors could explain, in part, the increased pain sensitivity in the SNI-SE animals. Previous studies support our results with findings demonstrating that exercise can prevent pregnancy complications and reestablish hormonal balance (Davenport et al., 2019).

In previous studies, we showed that some pain peptides (substance P and CGRP) are upregulated in the spinal cord of CD-1 male mice with neuropathic pain and downregulated with EE (Vachon et al., 2013). The present results with pregnant females clearly show that enkephalins and  $\beta$ -endorphins were increased with exercise in the frontal cortex of SNI-EE compared to SNI-SE females. Interestingly, oxytocin (OT) levels in the frontal cortex were increased in the SNI-SE group and decreased in the SNI-EE group. We saw no significant differences for DynA, SP, NKA, or CGRP (1 and 2) peptides between groups.

OT neurons project to different areas of the brain, such as orbitofrontal, cingulate, insular and medial prefrontal cortices, which all play a role in pain perception (Vargas-Martinez et al., 2014). The medial prefrontal cortex, in particular, is involved in chronic pain elicited in a spared nerve injury rat model (Metz et al., 2009). No study has assessed direct OT effects on cortical pain processing; however, OT is an analgesic at the levels of the brain stem and spinal cord (Boll et al., 2017). Our present results suggest that frontal-cortex OT levels could be an indicator of pain. Research has shown both endorphins (Gu et al., 2017) and enkephalins (Henry et al., 2017) to play



an important role in pain analgesia, and both peptides can be found in the medial prefrontal cortex. Interestingly, research has also shown that enkephalins play a role in resilience in response to chronic stress (Henry et al., 2017), which may accompany chronic pain and would therefore also be important in animal welfare. Pregnant mice in the SNI-EE group in the present study ran extensively on the running wheels. Previous research has shown that opioidergic mechanisms in the cerebrum correlate with exercise-induced mood changes sometimes known as the runner's high (Boecker et al., 2008). Therefore, our findings on enkephalins, endorphins and oxytocin correlate well with pain alleviation of neuropathic pain with exercise.

Our results show that exercise can reduce neuropathic pain in pregnant CD-1 female mice. We did not find that neuropathic pain impacts the neurodevelopment of mice pups, but our results suggest that it could impact live births. With replication of this study and exploration of these findings in humans, these findings could have implications for health care. For example, nurses could develop a pain-management plan for pregnant women with neuropathic pain that involved regular exercise to reduce hyperalgesia without increasing the risk to the developing fetus.

## References

- Beavers, K.M., Brinkley, T.E., & Nicklas, B.J. (2010). Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clinica Chimica Acta*, 411, 785-793.
- Beaulieu, P., Lussier, D., Porreca, F., & Dickenson, A.H. (2010). *Pharmacology of pain*. Seattle, WA: IASP Press.
- Boecker, H., Sprenger, T., Spilker, M.E., Henriksen, G., Koppenhoefer, M., Wagner, K.J., Valet, M., Berthele, A., & Tolle, T.R. (2008). The runner's high: opioidergic mechanisms in the human brain. *Cerebral Cortex*, 18, 2523-2531.
- Boll, S., Almeida de Minas, A.C., Raftogianni, A., Herpertz, S.C., & Grinevich, V. (2017). Oxytocin and Pain Perception: From Animal Models to Human Research. *Neuroscience*, 387, 149-161.
- Bowen, J., M., Chamley, L., Keelan, J.A., & Mitchell, M.D. (2002). Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: Roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta*, 12, 257-273.
- Briggs, G.G., Freeman, R.K., & Yaffe, S.J. (2002). *Drugs in pregnancy and lactation*. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkinss. 319-320.
- Bruehl, S., Chung, O.Y., Jirjis, J.N., & Biridepalli, S. (2005). Prevalence of clinical hypertension in patients with chronic pain compared to nonpain general medical patients. *Clinical Journal of Pain*, 21, 147-153.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., & Yaksh, T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53, 55–63.

- Crook, J., Rideout, E., & Browne, G. (1984). The prevalence of pain complaints in a general population. *Pain*, *18*, 299–316.
- Davenport, M.H. et al. (2019). Canadian Guideline for Physical Activity Throughout Pregnancy: Methodology. *Journal of Obstetrics and Gynecology*. (in press).
- Decosterd, I., & Woolf, C.J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, *87*, 149–158.
- Eclarinal, J.D., Zhu, S., Baker, M.S., Piyaathana, D. B., Coarfa, C., Fiorotto, M.L., & Waterland, R. A. (2016). Maternal exercise during pregnancy promotes physical activity in adult offspring. *FASEB Journal*, *30*, 2541-2548.
- Ferland, C.E., Pailleux, F., Vachon, P., & Beaudry, F. (2011). Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides*, *45*, 423-429.
- Franco, G.R., de Carvalho, A.F., Kroon, E.G., Lovagie, S., Werenne, J., Golgher, R.R., Ferreira, P.C., & Bonjardim, C.A. (1999). Biological activities of human amniotic membrane interferon. *Placenta*, *18*, 661-682.
- Giknis, M., & Clifford, C. B. (2007). *Reproductive and Behavioral Evaluations in Crl:CD-1®(ICR) Mice*. Charles River Laboratories, Wilmington, MA.
- Glynn, D., Sizemore, R. J., & Morton, A. J. (2007). Early motor development is abnormal in complexin 1 knockout mice. *Neurobiology of Disease*, *25*, 483-495.
- Grace, P.M., Fabisiak, T.J., Green-Fulgham, S.M., Anderson, N.D., Strand, K.A., Kwilas, A.J., Galer, E.L., Walker, F.R., Greenwood, B.N., Maier, S.F., Fleshner, M., & Watkins, L.R. (2016). Prior voluntary wheel running attenuates neuropathic pain. *Pain*, *157*, 2012-2023.

- Griep, E.N., Boersma, J.W., Lentjes, E.G., Prins, A.P., van der Korst, J.K., & de Kloet, E.R. (1998). Function of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in patients with fibromyalgia and low back pain. *Journal of Rheumatology*, 25, 1374-1381.
- Gu, Z.H., Wang, B., Kou, Z.Z., Bai, Y., Chen, T., Dong, Y.L., Li, H., & Li, Y.Q. (2017). Endomorphins: Promising Endogenous Opioid Peptides for the Development of Novel Analgesics. *Neurosignals*. 25, 98-116.
- Henry, M.S., Gendron, L., Tremblay, M.E., & Drolet, G. (2017). Enkephalins: Endogenous Analgesics with an Emerging Role in Stress Resilience. *Neural Plasticity*, 2017, 1546125.
- Horne, A.W., White, J.O., & Lalani E-N. (2000). The endometrium and embryo implantation. *British Medical Journal*, 321, 1301–1302.
- Iadarola, M.J., Brady, L.S., Draisci, G., & Dubner, R. (1988). Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain*, 35, 313–326.
- Kami, K., Taguchi, S., Tajima, F., & Senba, E. (2016). Histone Acetylation in Microglia Contributes to Exercise-Induced Hypoalgesia in Neuropathic Pain Model Mice. *Journal of Pain*, 17, 588-599.
- Kami. K., Tajima, F., & Senba, E. (2017). Exercise-induced hypoalgesia: potential mechanisms in models of neuropathic pain. *Anatomical Science International*, 92, 79-90.
- Khan, K., & Chang, J. (1997). Neonatal abstinence syndrome due to codeine. *Archives of Disease in Childhood. Fetal Neonatal Edition*, 76, F59-60.
- Koch, A., Zacharowski, K., Boehm, O., Stevens, M., Lipfert, P., von Giesen, H.J., Wolf, A., & Freynhagen, R. (2007). Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. *Inflammation Research*, 56, 32-37.

- Koren, G., Florescu, A., Costei, A.M., Boskovic, R., & Moretti, M.E. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during third trimester and the risk of premature closure of the ductus arteriosus: a meta-analysis. *Annals of Pharmacotherapy*, 40, 824-829.
- Li, Y., Matsuzaki, N., Masuhiro, K., Kameda, T., Taniguchi, T., Saji, F., Yone K, & Tanizawa O. (1992). Trophoblast-derived tumor necrosis factor-alpha induces release of human chorionic gonadotropin using interleukin-6 (IL-6) and IL-6-receptor-dependent system in the normal human trophoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 74, 184-191.
- Lima, L. V., Abner, T. S., & Sluka, K. A. (2017). Does exercise increase or decrease pain? Central mechanisms underlying these two phenomena. *Journal of Physiology*, 13, 4141-4150.
- Masuhiro, K., Matsuzaki, N., Nishino, E., Taniguchi, T., Kameda, T., Li, Y., Saji, F., & Tanizawa, O. (1991). Trophoblast-derived interleukin-1 (IL-1\_ stimulates the release of human chorionic gonadotropin by activating IL-6 and IL-6-receptor system in first trimester human trophoblasts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 72, 185-188.
- Meana M., Cho, R., & Desmeules, M. (2004). Chronic Pain: The Extra Burden on Canadian Women. *BMC Womens Health*, 4 (Supp 1):S17.
- Metz, A.E., Yau, H.J., Centeno, M.V., Apkarian, A.V., & Martina, M. (2009). Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 106, 2423–2428.
- Moore, R.A., Evans, P.J., Smith, R.F., & Loyd, J.W. (1983). Increased cortisol excretion in chronic pain. *Anesthesia*, 38, 788-791.

- Mumion, B.P. (2018). Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. *Australian Prescriber*, 41, 60-63.
- Neeck, G., Federlin, K., Graef, V., Rusch, D., & Schmidt, K.L. (1990) .Adrenal secretion of cortisol in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 17, 24-29.
- Ng, L., Reid, I., Gorelik, A., Galea, M., & Khan F. (2015). Environmental enrichment for stroke and other non-progressive brain injury. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 9, 1-12.
- Nguyen, A., Armstrong, E. A., & Yager, J. Y. (2007). Neurodevelopmental Reflex Testing in Neonatal Rat Pups. *Journal of Visual Experiments*, <https://www.jove.com/video/55261>.
- Nordeng, H., Ystrom, E., & Einarson, A. (2010). Perception of risk regarding the use of medications and other exposures during pregnancy. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 66, 207-214.
- Pailleux, F., Vachon, P., Lemoine, J., & Beaudry, F. (2013). Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides*, 47, 261-271.
- Paradowska, E., Blach-Olszewska, Z., Sender, J., & Jarosz, W. (1996). Antiviral nonspecific immunity of human placenta at term: possible role of endogenous tumor necrosis factors and interferons. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 16, 941-948.
- Parent-Vachon, M., & Vachon, P. (2018). Environmental enrichment alleviates chronic pain in rats following a spared nerve injury to induce neuropathic pain. A preliminary study. *Veterinary Medicine (Auckland)*, 9, 69-72.

- Pearce, E. E., Evenson, K. R., Symons Downs, D., & Steckler, A. (2013). Strategies to Promote Physical Activity During Pregnancy: A Systematic Review of Intervention Evidence. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 7. doi:10.1177/1559827612446416.
- Reynolds, E.W., Riel-Romero, R.M., & Bada, H.S. (2007). Neonatal abstinence syndrome and cerebral infarction following maternal codeine use during pregnancy. *Clinical Pediatrics* (Philadelphia), 46, 639-645.
- Rosen, S.F., Ham, B., Drouin, S., Boachie, N., Chabot-Dore, A.J., Austin, J.S., Diatchenko, L., & Mogil, J.S. (2017). T-Cell Mediation of Pregnancy Analgesia Affecting Chronic Pain in Mice. *Journal of Neuroscience*, 37, 9819-7982.
- Sanchez-Roige, S., Lalanza, J. F., Alvarez-Lopez, M. J., Cosin-Tomas, M., Grinan-Ferré, C., Pallas, M., Kaliman, P., & Escorihuela, R. M. (2014). Long-term wheel running changes on sensorimotor activity and skeletal muscle in male and female mice of accelerated senescence. *Age (Dordr)*, 36. Doi: 10.1007/s11357-014-9697-1
- Seki, H., Zosmer, A., Elder, M.G., & Sullivan, M.H. (1997). The regulation of progesterone and hCG production from placental cells by interleukin-1 $\beta$ . *Biochimica Biophysica Acta*, 1336, 342-348.
- Sluka, K. A., Frey-Law, L., & Bement, M. H. (2018). Exercise-induced pain and analgesia? Underlying mechanisms and clinical translation. *Pain*, 159, S91-S97.
- Stein, C., Millan, M.J., & Herz, A. (1988). Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 31, 445–451.

- Strittmatter, M., Bianchi, O., Ostertag, D., Grauer, M., Paulus, C., Fischer, C., & Meyer, S. (2005). Altered function of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in patients with acute, chronic and episodic pain. *Schmerz*, *19*, 109-116.
- Tai, L.W., Yeung, S.C., & Cheung, C.W. (2018). Enriched Environment and Effects on Neuropathic Pain: Experimental Findings and Mechanisms. *Pain Practice*.  
|<https://doi.org/10.1111/papr.12706>.
- Tajerian, M., Alvarado, S., Millecamps, M., Vachon, P., Crosby, C., Bushnell, M.C., & Stone, L.C. (2013). Peripheral nerve injury is associated with chronic, reversible changes in global DNA methylation in mouse prefrontal cortex. *PLoS One*, *8*, e55259.
- Tennant F. (2013) The physiologic effects of pain of the endocrine system. *Pain Therapeutics*, *2*, 75-86.
- Vachon, P., Millecamps, M., Low, L., Thompson, S.J., Pailleux, F., Beaudry, F., Bushnell, C.M., & Stone, L.S. (2013). Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain. *Behavioral and brain functions*, *9*, 22.
- Vargas-Martinez, F., Uvnäs-Moberg, K., Petersson, M., Olausson, H.A., & Jimenez-Estrada, I. (2014). Neuropeptides as neuroprotective agents: oxytocin a forefront developmental player in the mammalian brain. *Progress in Neurobiology*, *123C*, 37–78.
- Vincent, K., & Tracey, I. (2008). Hormones and their interaction with the pain experience. *Reviews in pain*, *2*, 20-24.
- Yagel, S., Lala, P.K., Powell, W.A., & Casper, R.F. (1989). Interleukin-1 stimulates human chorionic gonadotropin secretion by first trimester human trophoblast. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *68*, 992-995.



- Ye, H., Du, X., & Hua, Q. (2017). Effects of voluntary exercise on antiretroviral therapy-induced neuropathic pain in mice. *Journal of Physiological Sciences*, 68, 521-530.
- Yoon, B.H., Jun, J.K., Romero, R., Park, K.H., Gomez, R., Choi, J.H., & Kim, I.O. (1990). Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 181, 19-26.
- Yoon, B.H., Romero, R., Park, J.S., Kim, C.J., Kim, S.H., Choi, J.H., & Han, T.R. (2000). Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 182, 675-681.
- Zdravkovic, M., Knudsen, H.J., Liu, X., Zachar, V., Aboagye-Mathiesen, G., & Ebbsen, P. (1997). High interferon alpha levels in placenta , maternal, and cord blood suggest a protective effect against intrauterine herpes simplex virus infection. *Journal of Medical Virology*, 51, 210-213.
- Zhou, F., Chen, C., Huang, Y., Hu, H., Li, L., & Tan, Y. (2018). The effects of enriched environmental intervention on the parturition outcome and filial health of pregnant mice with chronic pain. *Biological Research for Nursing*, 20, 264-271.

**Table 1.** Gestation duration, number of pups at birth, and total number of pup deaths per group.

Variable	Sham SE	Sham EE	SNI-SE	SNI-EE
Gestation duration (days), mean $\pm$ SEM	18.6 $\pm$ 0.18	19.6 $\pm$ 0.18*	18.8 $\pm$ 0.41	19.1 $\pm$ 0.12
Number of pups, mean $\pm$ SEM	16.5 $\pm$ 0.8	14.0 $\pm$ 0.3	12.2 $\pm$ 1.5**	14.4 $\pm$ 1.7
Death of pups, <i>n</i>	0	0	6	0

*Note.* EE = environmental enrichment; SE = standard environment; sham = sham surgery; SNI = spare nerve injury surgery.

\* $p < 0.05$  for comparison between SNI-SE and all other groups.

\*\* $p < 0.01$  for comparison between sham SE and EE groups.

**Table 2.** Percent of mouse pups in each group that successfully completed the behavioral tests on Day 3 post birth.

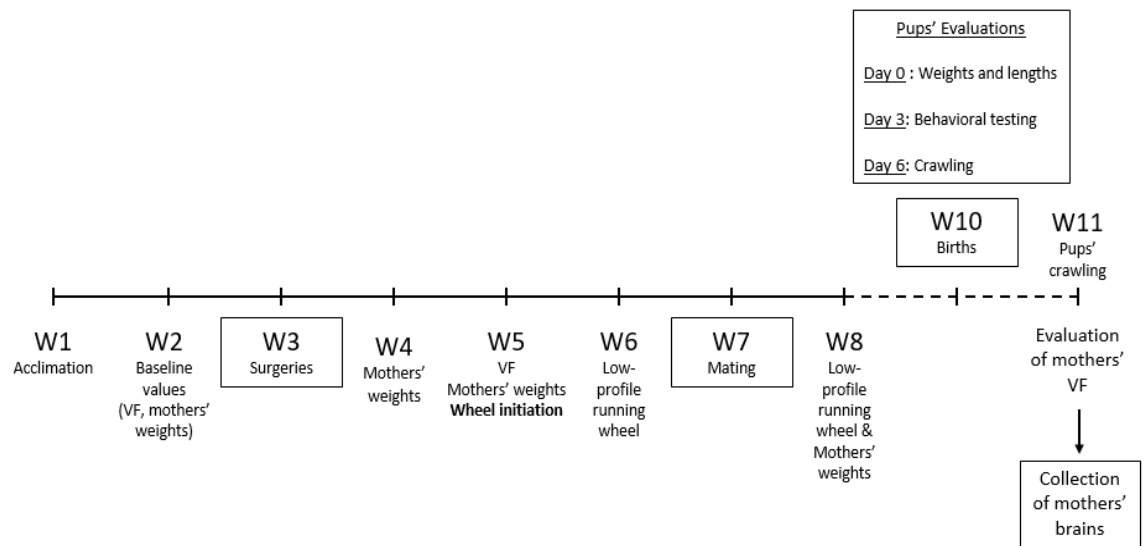
Test	Sham SE	Sham EE	SNI-SE	SNI-EE
Geotax	83	87	79	86
Righting	86	80	69*	88
Rooting	88	85	78	89
Grasping	98	98	92	98
Crawling	73	67	68	66

*Note.* EE = environmental enrichment; SE = standard environment; sham = sham surgery; SNI = spare nerve injury surgery. Total number of pups: Sham SE  $n=128$ , Sham EE  $n=112$ , SNI-SE  $n=98$  and SNI-EE  $n=115$ .

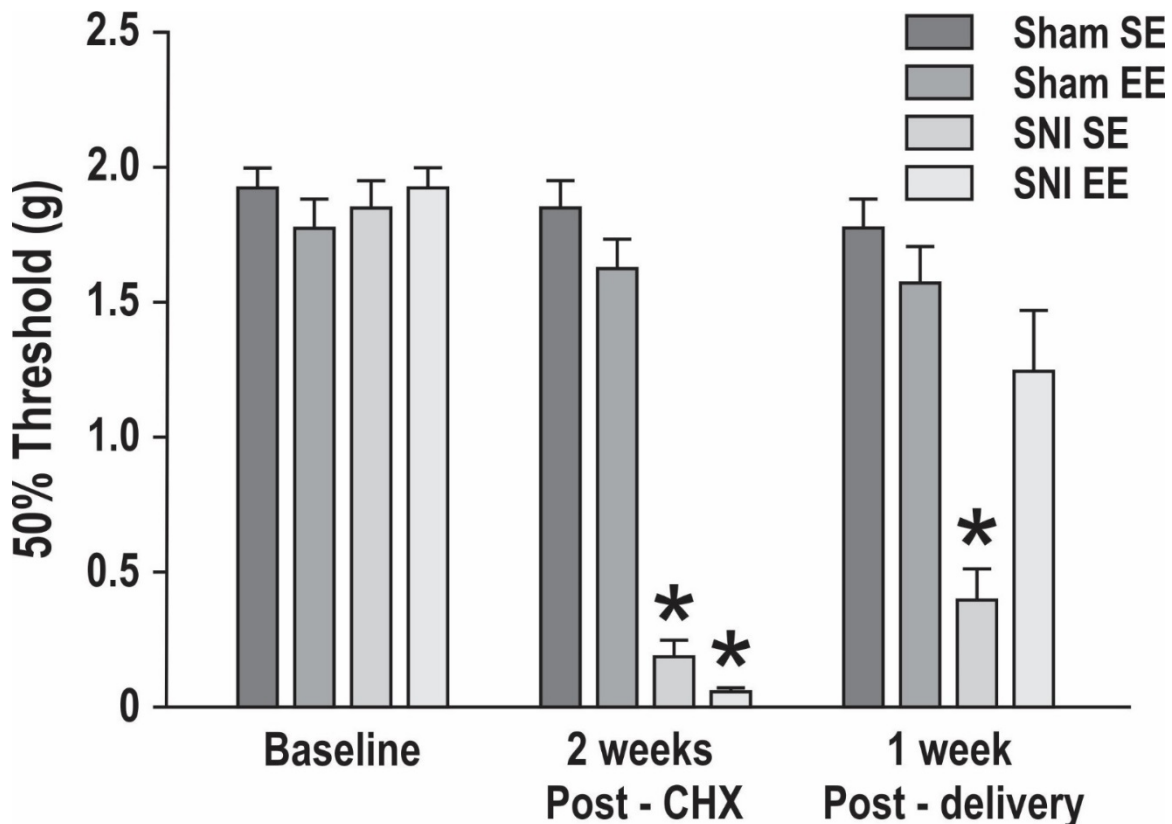
\* $p < 0.005$  in comparison to all other groups

**Figure 1.** Timeline of the research protocol.

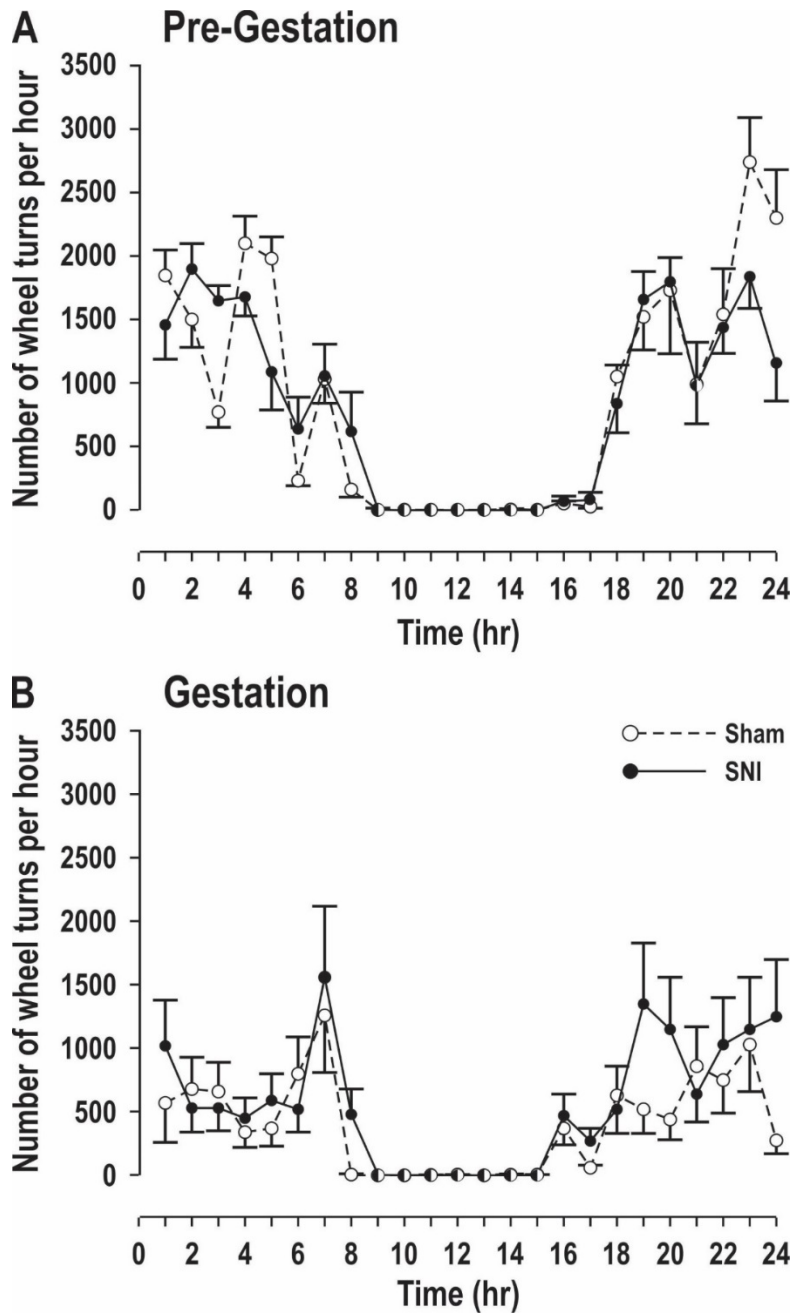
VF = von Frey filaments mechanical sensitivity evaluations; W = study week.



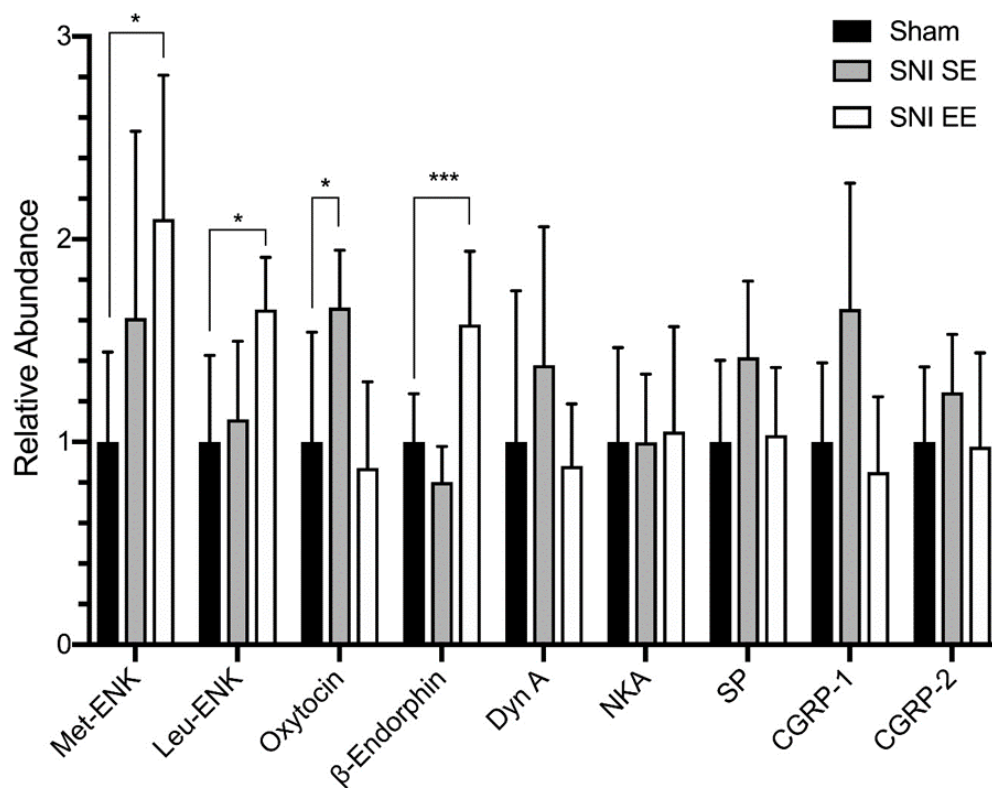
**Figure 2.** Mechanical sensitivity in female mice in the sham surgery with standard environment (sham SE), sham surgery with enriched environment (sham EE), and spared nerve injury surgery with standard (SNI-SE) and enriched (SNI-EE) environment groups ( $n = 8/\text{group}$ ). Mechanical sensitivity was measured using an up-down method (50% threshold) with von Frey filaments at baseline (before surgery), 2 weeks post-surgery (post-CHX) and 1 week post-delivery. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. \*Significant differences between the SNI-SE and SNI-EE groups compared to the sham groups at post-CHX and between the SNI-SE and all other groups at 1 week post-delivery ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 3.** Mean (S.E.M.) number of exercise wheel rotations/hr over 24 hr in the pre-gestational (A) and gestational (B) stages in sham surgery (sham) and spared nerve injury surgery (SNI) groups of female mice with environmental enrichment ( $n = 8/\text{group}$ ). There were no differences between groups in either recording period.



**Figure 4.** Selected peptide results for female mice presented as normalized data based on the peak mean areas for the sham group for relative quantification. CGRP = calcitonin-gene-related peptides; Dyn A = dynorphin A; met-ENK = met-enkephalin; leu-ENK = leu-enkephalin; NKA = neurokinin A; SNI-EE = spared nerve injury surgery + environmental enrichment group; SNI-SE = spared nerve injury surgery + standard environment group; SP = substance P. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  when comparing SNI-EE to Sham for beta-endorphins. No significant difference were found between Sham, SNI-SE and SNI-EE for Dynorphin A (Dyn A), neurokinin A (NKA), Substance P (SP), calcitonin-gene-related peptides (CGRP) 1 and 2.



## DISCUSSION

La crainte d'utiliser des médicaments durant la période de gestation est une des raisons principales de l'abstention de prise de médicaments analgésiques par les femmes enceintes souffrant de douleur (Nordeng et al., 2010). Si une douleur chronique sévère n'est pas traitée des problèmes de santé tels que l'hypertension, l'anxiété et la dépression causeront une grossesse problématique (Bruehl et al., 2005; Whitten et al., 2005). Parmi les drogues utilisées l'acétaminophène ne semble pas causer de problèmes congénitaux (Rebordosa et al., 2009), par contre l'aspirine et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens peuvent occasionner des problèmes chez le fœtus (Werler et al., 2009; Koren et al., 2006). Des risques sont associés à la prise de morphiniques (Briggs et al., 2002) et un syndrome du sevrage est observé chez le fœtus lorsque les patientes sont traitées même avec des doses faibles de codéine et ceci chez des mères non-utilisatrices (Khan et Chang, 1997; Reynolds et al., 2007). En revanche, un enrichissement de l'environnement, notamment de l'exercice pratiqué sur une base régulière, est une approche de plus en plus reconnue pour diminuer significativement la douleur chronique (Vachon et al., 2013). Cette approche non-médicamenteuse pourrait être utilisée chez les femmes enceintes pour assurer la santé et le bon développement du fœtus, ainsi que la santé de la mère. Afin de valider ce point, nous avons fait des expériences chez des souris neuropathiques en gestation avec et sans exercice.

Nos résultats démontrent clairement qu'une augmentation de l'exercice chez des souris gestantes diminue une douleur chronique évaluée par le test de von Frey, ce dernier mesurant la sensibilité mécanique. Dans notre étude, la douleur neuropathique chronique a été induite avec le modèle de Spared Nerve Injury (SNI) qui est un modèle reconnu et bien

validé pour causer une douleur neuropathique chronique pour une période allant jusqu'à 6 mois (Decosterd et Woolf, 2000). D'autres tests de sensibilité auraient pu être faits, mais le but de cette partie de l'expérience était de démontrer que suivant la chirurgie SNI les femelles étaient bien neuropathiques, en comparaison avec les animaux contrôles qui ont eu une chirurgie similaire sans la coupure et la ligature de deux branches du nerf sciatique (tibial et péroné commun laissant le nerf sural intact). Cette partie de l'expérience reflète un intérêt de recherche récent, car auparavant la plupart des modèles de douleur chronique se faisaient avec des mâles uniquement. Cela est assez étonnant puisque chez l'humain ce sont les femmes qui souffrent le plus de cette condition (Greenspan et al., 2007; Sorge et Strath, 2018). L'exercice a été favorisé dans un des groupes contrôles et un des groupes neuropathiques en introduisant des roues d'exercice dans les cages (Fast-Track Running wheels), et ceci deux semaines après la chirurgie jusqu'à approximativement 3 jours avant la parturition. Les résultats démontrent que la mesure d'exercice avec le système *low-profile running wheel* (Med Associates Inc.) qu'il n'y avait pas de différence entre le groupe contrôle et le groupe neuropathique démontrant ainsi que la chirurgie SNI n'a pas affecté l'exercice des animaux par contre le nombre de tours sur les roues d'exercice est moindre à la fin de la gestation, pour les deux groupes, ce qui n'est pas une surprise puisque que des femelles gestantes en fin de gestation sont plus grosses et elles ont moins tendance à faire de l'exercice (Eclarinal et al., 2016). L'essentiel est que l'exercice ait eu lieu durant la période de développement des souriceaux *in utero*. Les limitations de cette partie de l'étude sont multiples. Nous aurions pu étudier des femelles moins performantes en reproduction, car les souris CD-1 sont de bonnes reproductrices qui produisent des portées nombreuses (Giknis & Clifford, 2007). Possiblement, des femelles moins performantes auraient pu être



affectées différemment par une neuropathie. On a également travaillé avec des animaux de jeune âge, les souris pouvant se reproduire normalement jusqu'à 8 mois d'âge, nos résultats auraient pu être fort différents avec des animaux âgés. Il y a évidemment des problèmes concomitants à la gestation telle que l'hypertension, le diabète de gestation et les infections, qui sont des problèmes importants chez la femme enceinte (Brooten et al., 2007), et qui pourraient être des sujets d'étude futurs avec des modèles animaux.

Une seule étude (Zhou et al., 2018) a tenté d'évaluer l'impact d'une douleur neuropathique sur des femelles gestantes et leurs portées. Par contre ces auteurs ont utilisé un modèle inflammatoire chronique chez la souris en injectant l'adjuvant complet de Freund dans la patte arrière des animaux. Ceci cause une inflammation sévère et donc une réponse inflammatoire importante avec libération de cytokines dans le sang pouvant affecter le placenta et les fœtus. Leurs résultats démontrent plusieurs effets sur les portées dont des animaux prématurés avec des poids moindres, des mortalités à la naissance et des problèmes moteurs chez les souriceaux. Ces effets ont été en grande partie éliminés par un enrichissement de l'environnement, par contre cette étude a non seulement inclus des opportunités pour interagir plus avec l'environnement, mais la nourriture a été modifiée. Dans cette étude, des cacahouètes et des graines de tournesol ont été ajoutées à la diète des femelles gestantes, ceux-ci contiennent des anti-inflammatoires qui auraient clairement pu favoriser de meilleures portées. Ce qu'il faut retenir de l'étude de Zhou et al. (2018) est qu'une condition inflammatoire sévère peut être traitée sans médicament et que l'impact des infections pourrait en partie être traité avec un enrichissement de l'environnement, en considérant bien sûr que les éléments pathogènes n'affectent pas eux-mêmes le placenta et

les fœtus. Il serait donc intéressant de combiner l'exercice et des antioxydants dans des études futures sur l'impact des gestations problématiques.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que la durée de la gestation n'a pas été différente selon les groupes expérimentaux, contrairement à l'étude de Zhou et al. (2018) où les femelles neuropathiques gestantes ont eu leurs portées prématurément. Le seul groupe qui a présenté une différence dans notre étude est le groupe contrôle faisant de l'exercice où la durée de gestation était uniquement prolongée d'une journée. Considérant les valeurs normales de gestation des souris, ceci n'est pas anormal (Giknis & Clifford, 2007). Les résultats de Zhou et al. (2018) sont très certainement attribuables à l'inflammation sévère, car normalement l'injection d'adjuvant de Freund cause une inflammation maximale à 24 h, qui diminue progressivement jusqu'à une période de 7 jours (Iadarola et al., 1988; Stein et al., 1988). Par contre des doses supérieures aux protocoles acceptés ont été injectées aux animaux dans l'étude de Zhou et al. (2018) et ils rapportent une inflammation qui a duré 28 jours. En comparaison le modèle SNI, mise à part une légère perte de motricité puisque l'on coupe des nerfs mixtes, moteur et sensoriel, ne cause pas d'inflammation (Decosterd et Woolf, 2000).

Nos résultats démontrent que les nouveau-nés étaient très similaires considérant les caractéristiques physiques et motrices. Il n'y avait pas de différence sur les poids et la longueur des animaux en comparant les différents groupes expérimentaux, et il n'y a pas eu d'anomalies physiques apparentes. Par contre, le nombre de petits par portée était significativement moindre pour les femelles neuropathiques sans exercice. Ces résultats diffèrent de l'étude de Zhou et al. (2018) où ils ont démontré des fœtus plus petits et de poids moindres dans ce même groupe expérimental. Ces résultats suggèrent donc que

l'implantation ou le développement des embryons est altéré avec une douleur chronique inflammatoire, et que ceci peut être renversé par l'exercice. Comme la douleur chronique a une composante inflammatoire et stressante pour les animaux (McAllister, 2017) il est probable que les résultats observés sont une combinaison de plusieurs facteurs.

Les évaluations comportementales des souriceaux à trois et six jours post-naissance n'ont dans l'ensemble pas montré de différences significatives entre les groupes expérimentaux sauf pour le réflexe de *righting* qui a été moins réussi dans le groupe des femelles neuropathiques sans exercice. Ces tests évaluent différents aspects de la motricité. Le test de recouvrement est un test complexe exigeant la coordination motrice et de la force de l'ensemble du corps et donc le groupe SNI sans exercice pourrait avoir un retard développemental pour ce test. Nous n'avons pas évalué les animaux à des périodes plus tardives, ce qu'il faudrait faire pour correctement évaluer le déficit. Par contre, comme tous les autres tests moteurs sont normaux, nous suggérons une motricité quasi normale de ce groupe expérimental. Le test de géotaxie évalue la fonction du système vestibulaire et la coordination du corps pour faire le retournement et donc ce test nous dit que les animaux ont une capacité motrice normale. Il en va de même pour l'évaluation de la marche qui est une mesure de coordination motrice et de la préhension qui est un test de force et de coordination. Ces deux tests combinés nous disent également que les animaux étaient normaux. Il faudra donc voir avec des études subséquentes l'effet à long terme de la neuropathie chez les femelles gestantes sur le développement moteur des souriceaux.

Nos résultats diffèrent donc de l'étude de Zhou et al. (2018) qui rapporte un déficit moteur chez les souriceaux de femelles neuropathiques sans exercice. Nous avons fait une plus grande batterie de tests comportementaux chez les souriceaux et concluons qu'ils sont

moins affectés que prévu. Nous avions pensé que l'inflammation de la neuropathie aurait pu causer des problèmes chez les souriceaux naissants. Par contre, notre étude et celle de Zhou et al. (2018) ont mis le focus uniquement sur des tests moteurs, les tests cognitifs n'étant pas possibles à ce jeune âge. D'autres expériences seront donc nécessaires pour évaluer les effets de la neuropathie chez des femelles gestantes chez des animaux plus vieux. En conclusion, la douleur neuropathique induite chez des souris avec un modèle classique de SNI n'a pas modifié la durée de la gestation et le poids des mères, et n'a pas affecté le développement précoce ces nouveau-nés, par contre les femelles neuropathiques sans exercice ont eu des plus petites portées et des mortalités des nouveau-nés. Quelles sont les autres considérations que l'on doit évaluer dans la comparaison des résultats des deux articles? Une différence très importante est l'utilisation de souris Kummung dans l'étude de Zhou et al. (2018). La souris Kummung est un modèle de diminution de fertilité avec le vieillissement (Cui et al. 2013). Chez ces animaux le nombre de nouveau-nés diminue avec l'âge ainsi que le nombre de follicules ovariens et d'oocytes matures. Il y a beaucoup plus de chromosomes mal en lignés avec le vieillissement ainsi qu'un retard de la formation du pronucléus chez ces souris. Avec des défauts, ces souris ont donc une susceptibilité à des problèmes de reproduction. Il aurait donc été plus intéressant de tester l'inflammation chronique avec l'adjuvant de Freund chez des souris standards comme les CD-1. Il pourrait même être suggéré que l'étude de Zhou et al. (2018) aurait dû comporter un groupe contrôle de souris dont la fertilité n'est pas en cause. Il serait alors très intéressant de tester le modèle de neuropathie SNI avec des souris Kummung pour démontrer si la neuropathie peut causer des effets similaires. Donc, comme il a déjà été discuté, des souris de différentes souches et ayant différents problèmes reproducteurs doivent être testé avant

de tirer une conclusion globale sur l'impact de la neuropathie, et les effets de l'exercice, chez des animaux en gestation et leurs portées.

Différents mécanismes pourraient expliquer nos résultats. La famille des cytokines comprend les interleukines (IL), le facteur de nécrose tumorale (TNF), les chimiokines et les interférons (IFN). Certaines de ces molécules sont pro-inflammatoires et d'autres anti-inflammatoires (Beaulieu et al., 2010). Durant la gestation certaines cytokines jouent un rôle dans la physiologie du placenta tel que la régulation des hormones placentaires. La production de la gonadotrophine chorionique est stimulée par l'interleukine 1 $\beta$  (Masuhiro et al., 1991; Seki et al., 1997; Yagel et al., 1989) et TNF $\alpha$  (Li et al., 1992). Les cytokines participent à la réponse immunitaire des tissus reproducteurs durant la gestation (Zdravkovic et al., 1997). Les interférons dérivés des cellules trophoblastiques et le TNF alpha interfèrent avec la réplication des virus (Franco et al., 1999; Paradowska et al., 1996). Les cytokines jouent également un rôle dans la contractilité du myomètre, et différentes pathologies liées à la gestation tels que la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin (Bowen et al., 2002). Donc tout déséquilibre des cytokines pourrait interférer dans la gestation. Les cytokines sont connues pour être augmentées lors de douleur neuropathique (Koch et al., 2007), mais leur rôle dans le développement du fœtus est inconnu pour cette pathologie. Il resterait donc dans des expériences futures d'évaluer les concentrations de cytokines durant la gestation chez des mères avec ou sans neuropathie. Nous avons suggéré de faire ces analyses lors de la présentation de notre protocole, mais le comité de mérite scientifique nous a indiqué que cela poserait un stress supplémentaire aux femelles, et que dans un premier temps il serait mieux de ne pas faire ces analyses.

Les cytokines peuvent également avoir des effets délétères sur le fœtus, en traversant la barrière placentaire. On rapporte que suite à une infection maternelle, qu'une forte concentration de cytokines et de chimiokines peuvent causer une paralysie cérébrale et un retard du développement du fœtus (Yoon et al., 1997 & 2000). Puisque la concentration de cytokines à une corrélation directe avec l'intensité de la douleur (Koch et al., 2007) on pourrait considérer qu'une douleur neuropathique causerait peu d'inflammation en comparaison avec des modèles de douleur plus sévère, et donc pourrait possiblement affecter le nombre de souriceaux des portées sans affecter le développement comportemental, du moins pour ce qui est des habiletés motrices. On pourrait alors penser que l'exercice a significativement diminué les effets de la douleur neuropathique sur les portées des femelles neuropathiques puisque l'exercice diminue l'inflammation chronique (Beavers et al., 2010). Ceci expliquerait nos résultats en partie. Nos expériences ont été faites avec des animaux assez jeunes, et l'effet du vieillissement des mères risque également de modifier les résultats, ce qui est aussi une limitation de notre étude.

Des évidences sérologiques montrent que la présence de facteurs inflammatoires durant la gestation est responsable du développement de certaines maladies mentales post-natalité. Des niveaux élevés de cytokines durant le second trimestre de gestation favorise le développement de la schizophrénie et des problèmes psychotiques (Brown et al., 2000; Buka et al., 2001). Plusieurs cytokines semblent également impliquées dans le développement de l'autisme (Ashwood et al., 2011). Le débalancement des cytokines peut affecter le développement fœtal en agissant sur les cellules gliales (Hanisch, 2002). Les astrocytes sont importants pour le développement des neurones et la formation des synapses (Benveniste, 1998; Ullian et al., 2004) et une astroglie pourrait être relié à un

débalancement des cytokines circulantes (Little et O'Callagha, 2001). À l'appui de ces articles, il serait intéressant de faire des tests de cognition et de l'état émotif des souriceaux de ces portées de mères neuropathiques quand ils auront atteint l'âge adulte. Ces évaluations pourraient comprendre le test de nage forcée de Porsolt et la préférence au glucose (Overstreet, 2012) ainsi que le test de suspension par la queue (Steru et al., 1985) pour l'évaluation de la sensibilité à la dépression. Pour l'apprentissage et la cognition, il existe différents labyrinthes d'apprentissages utilisés chez les rongeurs, tels que celui de Morris (Crawley, 2007). On devrait également s'attarder à des tests d'interaction sociale (Vaishnav et Nestler, 2008). Donc, une batterie de tests pourrait être faite chez les animaux de mères neuropathiques une fois l'âge adulte atteint.

D'autres mécanismes en relation avec le système endocrinien pourraient expliquer nos résultats (Tennant, 2013). La douleur chronique est associée au stress qui stimulera l'hypothalamus et la glande pituitaire qui secrèteront des facteurs trophiques causant la relâche d'hormones des surrénales et des gonades (Griep et al., 1998; Moore et al., 1983; Neeck et al., 1990; Shenkin, 1964; Strittmatter et al., 2005). Il est reconnu qu'une douleur chronique sans soulagement causera l'élévation d'ACTH de la pituitaire, le cortisol ou corticostérone des surrénales et de la testostérone des gonades. Si le stress perdure, il y aura une dépression significative de la production de ces hormones (Tennant, 2013; Griep et al., 1998; Neeck et al., 1990; Strittmatter et al., 2005). Ces modifications hormonales bloqueront l'implantation des embryons (Horne et al., 2000). Des diminutions d'estrogènes, de progestérone et de testostérone affecteront également les femelles gestantes (Vincent et Tracey, 2008). L'estrogène, la progestérone et la testostérone sont associés à l'analgésie et donc une diminution causerait une augmentation de la sensibilité

des animaux à la douleur, et donc une augmentation de l'allodynie des femelles neuropathiques dans un environnement sans exercice. Des études récentes chez les femmes gestantes appuient la nécessité de l'exercice durant la gestation afin d'éviter les complications en rétablissant des niveaux normaux des hormones (Davenport et al., 2019). Ceci constitue donc d'autres études qui devaient être faites pour évaluer le rôle de l'exercice pour le traitement de la douleur neuropathique durant la gestation.

Nos résultats démontrent clairement que l'exercice a diminué de façon significative la douleur neuropathique des femelles avec une chirurgie SNI. Ceci suggère des modifications de la neurotransmission centrale. Dans une étude précédente, il a été démontré que certains peptides algogènes de la moelle épinière (substance P et CGRP) sont augmentés chez des souris males CD-1 ayant une douleur neuropathique, alors qu'un enrichissement de l'environnement a diminué la douleur et que les peptides algogènes étaient augmentés dans cette situation (Vachon et al., 2013). Ceci suggère que le traitement de l'information douleur, en relation avec la douleur se fait déjà dans la moelle épinière, mais comme la perception et l'appréciation de la douleur se fait au niveau du cerveau, nous avons voulu analyser des modifications de peptides au niveau du cortex frontal. Deux circuits de douleur sont connus pour traiter deux aspects de la douleur, l'un sensoriel et l'autre émotionnel (Bushnell et al., 2013). Le circuit émotionnel de la douleur passe par l'amygdale, l'insula, le cortex cingulaire et le cortex préfrontal. Nous avons analysé les peptides de la région frontale du cerveau des souris dans ce contexte. Le choix du tissu est aussi motivé par la quantité de tissu nerveux, car les autres structures telles que l'amygdale sont trop petites pour les isoler correctement afin de faire une analyse par spectrométrie de masse, considérant les limites de la méthode de notre étude. Nos résultats montrent que les



femelles neuropathiques ont eu une augmentation des enképhalines et des  $\beta$ -endorphines avec l'exercice, donc associé avec la diminution de la douleur. Ces molécules sont déjà connues pour leur modulation de la perception de la douleur par contre l'ocytocine a aussi été modulée avec la douleur, et ceci n'a jamais été démontré. Les niveaux d'ocytocine dans le cortex frontal ont augmenté chez les femelles neuropathiques sans exercice, et ont diminué avec l'exercice. Les neurones ocytocinergiques projettent au cortex orbitofrontal, le cortex cingulaire, l'insula et le cortex préfrontal médian (Vargas-Martinez et al., 2014) qui joue un rôle important dans l'émotion de la douleur (Bushnell et al., 2013). Le cortex préfrontal médian est une région importante activée par le modèle SNI (Metz et al., 2009). Aucune étude n'a démontré un rôle de l'ocytocine dans la perception de la douleur, par contre son rôle analgésique au niveau de la moelle épinière et du tronc cérébral est bien connu (Boll et al., 2018). Les endorphines (Gu et al., 2017) et les enképhalines (Henry et al., 2017) se retrouvent dans le cortex frontal et ils sont des analgésiques centraux. Des études futures pourraient également mettre l'emphasis sur l'ocytocine et ses récepteurs comme molécule thérapeutique pour la douleur chronique en lien avec la gestation.

Les concentrations d'autres peptides analysés dans notre étude (DynA, SP, NKA, and CGRP (1 and 2)) n'étaient pas différentes selon les groupes expérimentaux. Ces molécules (dynorphines) ont plus de fonctions dans les structures profondes du cerveau concernant la douleur (Corder et al., 2018) et elles sont tous reliées au stress et aux émotions (Thakker-Varia et Adler, 2009). Il n'est donc pas surprenant qu'elles ne montrent pas de variations dans nos différents groupes expérimentaux. Le moment de la collecte des tissus est une limitation de notre étude. Il faudrait faire des analyses de tissus chez des femelles trois

mois après l'induction de la neuropathie, et plus de trois mois après. Il est démontré qu'après trois mois dans un état neuropathique une dépression, autant chez l'homme que les animaux se met en place (Bushnell et al., 2015) et que l'impact de cette dépression peut avoir des conséquences sur le développement neuronal des fœtus (Kinsella et Monk, 2009). Il serait intéressant dans des études futures, avec des mères neuropathiques et dépressives, d'évaluer d'autres peptides, surtout en lien avec la dépression (Thakker-Varia et Adler, 2009) telle que la substance P qui est bien connue pour augmenter au niveau du système nerveux central lors de la dépression (Rupniak, 2002; Schwarz et Ackenheil, 2002; Geraciotti et al., 2006) et est également reliée au stress et à l'anxiété (Ebner et Singewald, 2006). Les enképhalines ont également dans la résilience au stress chronique (Henry et al., 2017) et accompagnent une douleur chronique.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

En somme, ce projet de recherche a permis de confirmer que l'exercice physique permet de réduire considérablement la douleur neuropathique chez les mères atteintes de cette condition. Les femelles neuropathiques ayant eu accès à la roue d'exercice avaient une augmentation significative d'enképhalines et d'endorphines en comparaison aux groupes contrôles. Les femelles neuropathiques sans enrichissement de l'environnement avaient également une augmentation significative d'ocytocine comparativement aux autres groupes. Pour les souriceaux, le nombre de décès à la naissance était plus important dans le groupe SNI ES. Aussi, le nombre de chaque portée du groupe SNI ES était significativement plus petit. Cependant, les tests comportementaux étaient similaires dans tous les groupes à l'exception du test de recouvrement. La douleur neuropathique ne semble pas avoir d'effet sur le neurodéveloppement des souriceaux, mais semble avoir un effet sur le nombre de la portée et sur la mortalité. Notre étude suggère donc que l'exercice serait une alternative au traitement de la douleur chronique des mères et pour l'amélioration de la performance reproductrice. On peut donc en déduire que l'accomplissement d'exercice physique chez les femmes atteintes de douleur chronique lors de leur grossesse pourrait être une solution intéressante. Afin d'implanter cette intervention de manière efficace chez l'humain, d'autres études seront nécessaires.

Cette étude est une première de sa catégorie et pourrait être approfondie à de nombreux angles différents. Il serait important de savoir l'effet que la neuropathie a sur l'implantation des fœtus dans le placenta. Il serait aussi intéressant de refaire cette expérience avec d'autres espèces. Aussi, nous pourrions explorer le phénomène en présence de

comorbidités gestationnelles et des facteurs environnementaux. Une autre perspective serait d'étudier les souriceaux ayant atteint l'âge adulte, car il a été démontré que le stress néonatal associé à la douleur chronique des mères pourrait mener à des problèmes de cognition (Lazinski et al., 2008). Ainsi, nous pourrions étudier les souriceaux avec différents tests cognitifs. Donc, plusieurs opportunités d'études sont suggérées grâce aux connaissances acquises par notre étude.

## BIBLIOGRAPHIE

Alley, J., Diamond, L. M., Lipschitz, D. L., & Grewen, K. (2019). Associations between oxytocin and cortisol reactivity and recovery in response to psychological stress and sexual arousal. *Psychoneuroendocrinology*, 106, 47-56.

Ander, S. E., Diamond, M. S., & Coyne, C. B. (2019). Immune responses at the maternal-fetal interface. *Science Immunology*, 4(31), 1-10.

Apkarian, A. V., & Hodge, C. J. (1989). Primate spinothalamic pathways: I. A quantitative study of the cells of origin of the spinothalamic pathway. *The Journal of Comparative Neurology*, 288(3), 447-473.

Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., & Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behaviour, and Immunity*, 25(1), 40-45.

Babb, M., Koren, G., & Einarson, A. (2010). Treating pain during pregnancy. *Canadian Family Physician*, 56(1), 25-27.

Bateman, B. T., Hernandez-Diaz, S., Rathmell, J. P., Seeger, J. D., Doherty, M., Fischer, M. A., & Huybrechts, K. F. (2014). Patterns of opioid utilization in pregnancy in a large cohort of commercial insurance beneficiaries in the United States. *Anesthesiology*, 120(5), 1216-1224.

Baumans, V., Coke, C., Green, J., Moreau, E., Morton, D., Patterson-Kane, E., ... Loo, P. V. (2007). *Making Lives Easier for Animals in Research Labs*. Washington, DC : Animal Welfare Institute.

Beaudry, F., Ferland, C. E., & Vachon, P. (2009). Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 23(9), 940-950.

Beaulieu, P., Lussier, D., Porreca, F., & Dickenson, A.H. (2010). *Pharmacology of pain*. Seattle, WA: IASP Press.

Beavers, K. M., Brinkley, T. E., & Nicklas, B. J. (2010). Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clinica Chimica Acta*, 411(11-12), 785-793.

Behringer, R., Gertenstein, M., Nagy, K. V., & Nagy, A. (2016). Selecting Female Mice in Estrus and Checking Plugs. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(8). doi: 10.1101/pdb.prot092387.

Belmonte, C., & Cervero, F. (1996). *Neurobiology of Nociceptors*. Oxford University Press. doi:10.1093/acprof:oso/9780198523345.001.0001

Benveniste, E. N. (1998). Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokines and growth factors reviews*, 9(3-4), 259-275.

Bennett, G. J., & Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33(1), 87-107.

Bivehed, E., Strömvall, R., Bergquist, J., Bakalkin, G., & Andersson, M. (2017). Region-specific bioconversion of dynorphin neuropeptide detected by in situ histochemistry and MALDI imaging mass spectrometry. *Peptides*, 87, 20-27.

Boll, S., Almeida de Minas, A. C., Raftogianni, A., Herpertz, S. C., & Grinevich, V. (2018). Oxytocin and Pain Perception: From Animal Models to Human Research. *Neuroscience*, 387, 149-161.

Bonin, R. P., Bories, C., & De Koninck, Y. (2014). A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. *Molecular Pain*, 10, 26.

Bowen, J., M., Chamley, L., Keelan, J.A., & Mitchell, M.D. (2002). Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: Roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta*, 23(4), 257-273.

Briggs, G. G., Freeman, R. K., & Yaffe, S. J. (2002). *Drugs in pregnancy and lactation* (6<sup>e</sup> éd., p. 319-320). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Brooten, C., Youngblut, J. M., Donahue, D., Hamilton, M., Hannan, J., & Felber Neff, D. (2007). Women with High-Risk Pregnancies, Problems, and APN Interventions. *Journal of Nursing Scholarship*, 39(4), 349-357.

Brown, A. S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Goetz, R., Begg, M. D., Gorman, J. M., & Susser, E. S. (2000). Maternal exposure to respiratory infections and adult schizophrenia spectrum disorders: a prospective birth cohort study. *Schizophrenia bulletin*, 26(2), 287-295.

Bruce, H. M. (1960). A block in pregnancy in the mouse caused by proximity of strange males. *Journal in Reproduction and Fertility*, 1, 96-103.

Bruehl, S., Chung, O. Y., Jirjis, J. N., & Biridepalli, S. (2005). Prevalence of clinical hypertension in patients with chronic pain compared to nonpain general medical patients. *The Clinical Journal of Pain*, 21(2), 147-153.

Buka, S. L., Tsuang, M. T., Torrey, E. F., Klebanoff, M. A., Wagner, R. L., & Yolken, R. H. (2001). Maternal cytokine levels during pregnancy and adult psychosis. *Brain, Behaviour, and Immunity*, 15(4), 411-420.

Burton, G. J., Charnock-Jones, D. S., & Jauniaux, E. (2009). Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction*, 138(6), 895-902.

Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 370 (1663), 1-8.

Bushnell, M. C., Case, L. K., Ceko, M., Cotton, V. A., Gracely, J. L., Low, L. A., ... Villemure, C. (2015). Effect of environment on the long-term consequences of chronic pain. *Pain*, 156, S42-S49.

Bushnell, M. C., Ceko, M., & Low, L. A. (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(7), 502-511.

Campbell, J. N., & Meyer, R. A. (2006). Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*, 52(1), 77-92.

Carter, A. M. (2000). Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studies--a review. *Placenta*, 21(Supplement A, S31-S37.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., & Yaksh, T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53, 55-63.

Chucuri, T. M., Monteiro, J. M., Lima, A. R., Salvadori, M. L., Kfoury Junior, J. R., & Miglino, M. A. (2010). A review of immune transfer by the placenta. *Journal of Reproductive Immunology*, 87(1-2), 14-20.

Cohen, S. P., & Mao, J. (2014). Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*, 348, 1-12.

Corder, G., Castro, D. C., Bruchas, M. R., & Scherrer, G. (2018). Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annual Review of Neuroscience*, 41, 453-473.

Costentin, J. (2000). La douleur et ses principaux médiateurs. *Annales de Pharmacologie*, 58(2), 77-83.

Cower, R., Stasiowska, M. K., Laycock, H., & Bantel, C. (2015). Assessing pain objectively: the use of physiological markers. *Anaesthesia*, 70(7), 828-847.

Crawley, J. N. (2007). *What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice* (2<sup>e</sup> éd.). Hoboken, NJ: Wiley-Interscience.

- Cui, L. B., Zhou, X. Y., Zhao, Z. J., Li, Q., Huang, X. Y., & Sun, F. Z. (2013). The Kunming mouse: as a model for age-related decline in female fertility in human. *Zygote*, 21(4), 367-376.
- Dalakas, M. C. (2001). Peripheral neuropathy and antiretroviral drugs. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 6(1), 14-20.
- Dalayeun, J. F., Norès, J. M., & Bergal, S. (1993). Physiology of beta-endorphins. A close-up view and a review of the literature. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 47(8), 311–320.
- Davenport, M. H., Ruchat, S.-M., Mottola, M. F., Davies, G. A., Poitras, V. J., Gray, C. E., ... Zehr, L. (2019). Canadian Guideline for Physical Activity Throughout Pregnancy: Methodology. *Journal of Obstetrics and Gynecology*, 40(11), 1468-1483.
- Day, R., Lazure, C., Basak, A., Boudreault, A., Limperis, P., Dong, W., & Lindberg, I. (1998). Prodynorphin processing by proprotein convertase 2. Cleavage at single basic residues and enhanced processing in the presence of carboxypeptidase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 829-836.
- Decosterd, I., & Woolf, C.J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, 87, 149–158.
- Dentino, A., Medina, R., & Steinberg, E. (2017). Pain in the Elderly: Identification, Evaluation, and Management of Older Adults with Pain Complaints and Pain-related Symptoms. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 44(3), 519-528.
- Duraku, L. S., Hossaini, M., Hoendervangers, S., Falke, L. L., Kambiz, S., Mudera, V. C., ... Ruigrok, T. J. (2012). Spatiotemporal dynamics of re-innervation and hyperinnervation patterns by uninjured CGRP fibers in the rat foot sole epidermis after nerve injury. *Molecular Pain*, 8, 61.
- Dutta, S., & Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*, 152, 244-248.
- Ebner, K., & Singewald, N. (2006). The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids*, 31(3), 251–272.
- Eclarinal, J. D., Zhu, S., Baker, M. S., Piyaathna, D. B., Coarfa, C., Fiorotto, M. L., & Waterland, R. A. (2016). Maternal exercise during pregnancy promotes physical activity in adult offspring. *FASEB Journal*, 30(7), 2541-2548.
- Finley, J. C., Lindström, P., & Petrusz, P. (1981) Immunocytochemical localization of beta-endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 33(1), 28-42.



Foley, K. M., Kourides, I. A., Inturrisi, C. E., Kaiko, R. F., Zaroulis, C. G., Posner, J. B., ... Li, C. H. (1979). beta-Endorphin: analgesic and hormonal effects in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76(10), 5377-5381.

Fox, W. M. (1965). Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Animal Behaviour*, 13(2-3), 234-241.

Franco, G.R., de Carvalho, A.F., Kroon, E.G., Lovagie, S., Werenne, J., Golgher, R.R., ... Bonjardim, C.A. (1999). Biological activities of human amniotic membrane interferon. *Placenta*, 20(2-3), 189-196.

Freemark, M. (2006). Regulation of maternal metabolism by pituitary and placental hormones: roles in fetal development and metabolic programming. *Hormone Research*, 65(Supplement 3), 41-49.

Gabriel, A. F., Paoletti, G., Della Seta, D., Panelli, R., Marcus, M. A., Farabollini, F., ... Joosten, E. A. (2010). Enriched environment and the recovery from inflammatory pain: Social versus physical aspects and their interaction. *Behavioural Brain Research*, 208(1), 90-95.

Garcia-Larrea, L., & Magnin, M. (2008). Physiopathologie de la douleur neuropathique : revue des modèles expérimentaux et des mécanismes proposés. *La Presse Médicale*, 37(2), 315-340.

Geraciotti, T. D., Carpenter, L. L., Owens, M. J., Baker, D. G., Ekhtor, N. N., Horn, P. S., ... Nemeroff CB. (2006). Elevated cerebrospinal fluid substance p concentrations in posttraumatic stress disorder and major depression. *The American Journal of Psychiatry*, 163(4), 637-643.

Giknis, M., & Clifford, C. B. (2007). *Reproductive and Behavioral Evaluations in Crl:CD-1®(ICR) Mice*. Charles River Laboratories, Wilmington, MA.

Glynn, D., Sizemore, R. J., & Morton, A. J. (2007). Early motor development is abnormal in complexin 1 knockout mice. *Neurobiology of Disease*, 25, 483-495.

Goh, J., & Ladiges, W. (2016). Voluntary Wheel Running in Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 5(4), 283-290.

Goldstein, A., & Ghazarossian, V. E. (1980). Immunoreactive dynorphin in pituitary and brain. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 77(10), 6207-6210.

Goodman, R. L., Coolen, L. M., & Lehman, M. N. (2014). A Role for Neurokinin B in Pulsatile GnRH Secretion in the Ewe. *Neuroendocrinology*, 99(1), 18-32.

Gorczyca, R., Filip, R., & Walczak, E. (2013). Psychological Aspects of Pain. *Annals of Agriculture and Environmental Medicine*, 20(1), 23-27.

Gowans, S. E., deHueck, A., Voss, S., Silaj, A., & Abbey, S. E. (2004). Six-month and one-year followup of 23 weeks of aerobic exercise for individuals with fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatism*, 51(6), 890-898.

Grace, P. M., Fabisiak, T. J., Green-Fulgham, S. M., Anderson, N. D., Strand, K. A., Kwilasz, A. J., ... Watkins, L. R. (2016). Prior voluntary wheel running attenuates neuropathic pain. *Pain*, 157(9), 2012-2023.

Greenspan, J. D., Craft, R. M., LeResche, L., Arendt-Nielsen, L., Berkley, K. J., Fillingim, R. B., ... Traub, R. J.: Consensus Working Group of the Sex, Gender, and Pain SIG of the IASP. (2007) Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. *Pain*, 132(Suppl. 1), S26-S45.

Griep, E. N., Boersma, J. W., Lentjes, E. G., Prins, A. P., van der Korst, J. K., & de Kloet, E. R. (1998). Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with fibromyalgia and low back pain. *Journal of Rheumatology*, 25(7), 1374-1381.

Grigsby, P.L. (2016). Animal Models to Study Placental Development and Function throughout Normal and Dysfunctional Human Pregnancy. *Seminars in Reproductive Medicine*. 34(1), 11-6.

Gu, Z. H., Wang, B., Kou, Z. Z., Bai, Y., Chen, T., Dong, Y. L., ... Li, Y.Q. (2017). Endomorphins: Promising Endogenous Opioid Peptides for the Development of Novel Analgesics. *Neurosignals*, 25(1), 98-116.

Hanisch, U. K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40(2), 140-155.

Harber, V. J., & Sutton, J. R. (1984). Endorphins and exercise. *Sports Medicine*, 1(2), 154-171.

Hayden, J. A., van Tulder, M. W., Malmivaara, A., & Koes, B. W. (2005). Exercise therapy for treatment of non-specific low back pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 20(3). doi : 10.1002/14651858.CD000335.pub2

Henry, M. S., Gendron, L., Tremblay, M. E., & Drolet, G. (2017). Enkephalins: Endogenous Analgesics with an Emerging Role in Stress Resilience. *Neural Plasticity*, 2017, 1546125.

Heykants, M., & Mahabir, E. (2016). Estrous cycle staging before mating led to increased efficiency in the production of pseudopregnant recipients without negatively affecting embryo transfer in mice. *Theriogenology*, 85(5), 813-821.

Holsboer, F. (2003). The role of peptides in treatment of psychiatric disorders. *Journal of Neural Transmission* (Supplement), 64, 17-34.

Horne, A. W., White, J. O., & Lalani E-N. (2000). The endometrium and embryo implantation. *British Medical Journal*, 321(7272), 1301–1302.

Iadarola, M.J., Bradym, L.S., Draiscim, G., & Dubner, R. (1988). Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain*, 35(3), 313–26.

Jacobsen, K. R., Mikkelsen, L. F., & Hau, J. (2010). The effect of environmental enrichment on the behavior of captive tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Lab Animal*, 39, 269-277.

Jaggi, A. S., Jain, V., & Singh, N. (2011). Animal models of neuropathic pain. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 25(1), 1-28.

Kami, K., Taguchi, S., Tajima, F., & Senba, E. (2016). Histone Acetylation in Microglia Contributes to Exercise-Induced Hypoalgesia in Neuropathic Pain Model Mice. *The Journal of Pain*, 17(5), 588-599.

Kami, K., Tajima, F., & Senba, E. (2017). Exercise-induced hypoalgesia: potential mechanisms in models of neuropathic pain. *Anatomical Science International*, 92(1), 79-90.

Kane, S. V., & Acquah, M. D. (2009). Placental transport of immunoglobulins: a clinical review for gastroenterologists who prescribe therapeutic monoclonal antibodies to women during conception and pregnancy. *American Journal of Gastroenterology*, 104(1), 228-233.

Keay, K. A., Feil, K., Gordon, B. D., Herbert, H. & Bandler, R. (1997). Spinal afferents to functionally distinct periaqueductal gray columns in the rat: an anterograde and retrograde tracing study. *The Journal of Comparative Neurology*, 385(2), 207-229.

Keefe F., Pryor R. (2007) Assessment of Pain Behaviors. In: Schmidt R., Willis W. (eds) Encyclopedia of Pain. Springer, Berlin, Heidelberg. Doi: [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-540-29805-2\\_302](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-540-29805-2_302)

Kerr, F. W. (1975). The ventral spinothalamic tract and other ascending systems of the ventral funiculus of the spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, 159(3), 335-356.

Khan, K., & Chang, J. (1997). Neonatal abstinence syndrome due to codeine. *Archive of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*, 76(1), F59-60.

Kinsella, M. T., & Monk, C. (2009). Impact of Maternal Stress, Depression & Anxiety on Fetal Neurobehavioral Development. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 52(3), 425-440.

Koch, A., Zacharowski, K., Boehm, O., Stevens, M., Lipfert, P., von Giesen, H. J., ... Freynhagen, R. (2007). Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. *Inflammation Research*, 56(1), 32-37.

Koren, G., Florescu, A., Costei, A. M., Boskovic, R., & Moretti, M. E. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during third trimester and the risk of premature closure of the ductus arteriosus: a meta-analysis. *The Annals of Pharmacotherapy*, 40(5), 824-829.

Lash, G. E., Naruse, K., Innes, B. A., Robson, S. C., Searle, R. F., & Bulmer, J. N. (2010). Secretion of angiogenic growth factors by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in early human pregnancy. *Placenta*, 31(6), 545-548.

Lazinski, M. J., Shea, A. K., & Steiner, M. (2008). Effects of maternal prenatal stress on offspring development: a commentary. *Archives of Women's Mental Health*, 11(5-6), 363-375.

Leach, L., Babawale, M. O., Anderson, M., & Lammiman, M. (2002). Vasculogenesis, angiogenesis and the molecular organisation of endothelial junctions in the early human placenta. *Journal of Vascular Research*, 39(3), 246-259.

Lehmann, M. L., Herkenham, M. (2011). Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *Journal of Neuroscience*, 31(16), 6159-6173.

Leiser, R., & Kaufman, P. (1994). Placental structure: in a comparative aspect. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 102(3), 122-134.

Li, Y., Matsuzaki, N., Masuhiro, K., Kameda, T., Taniguchi, T., Saji, F., Yone K, & Tanizawa O. (1992). Trophoblast-derived tumor necrosis factor-alpha induces release of human chorionic gonadotropin using interleukin-6 (IL-6) and IL-6-receptor-dependent system in the normal human trophoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 74(1), 184-191.

Little, A. R., & O'Callagha, J. P. (2001). Astrogliosis in the adult and developing CNS: is there a role for proinflammatory cytokines? *Neurotoxicology*, 22(5), 607-618.

Lubics, A., Reglodi, D., Tamas, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., & Lengvari, I. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioural Brain Research*, 157(1), 157-165.

Malmros, B., Mortensen, L., Jensen, M. B., & Charles, P. (1998). Positive effects of physiotherapy on chronic pain and performance in osteoporosis. *Osteoporosis International*, 8(3), 215-221.

Marchand, S. (2005). Neurophysiologie de la douleur. In: Beaulieu, P. (Ed.), *Pharmacologie de la Douleur*. Les Presses de l'Université de Montreal, Montréal, 3-37.

Markova, G., & Siposova, B. (2019). The role of oxytocin in early mother-infant interactions: Variations in maternal affect attunement. *Infant Behavior and Development*, 55, 58-68.

Masuihi, K., Matsuzaki, N., Nishino, E., Taniguchi, T., Kameda, T., Li, Y., ... Tanizawa, O. (1991). Trophoblast-derived interleukin-1 (IL-1 $\beta$ ) stimulates the release of human chorionic gonadotropin by activating IL-6 and IL-6-receptor system in first trimester human trophoblasts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 72(3), 185-188.

McAllister, M. J. (2017). Stress, Inflammation and Chronic Pain. Repéré à <https://www.instituteforchronicpain.org/blog/item/152-55stress-inflammation-and-chronic-pain>

McCreary, J. K., & Metz, G. (2016). Environmental enrichment as an intervention for adverse health outcomes of prenatal stress. *Environmental Epigenetics*, 2(3), 1-12.

Metz, A. E., Yau, H. J., Centeno, M. V., Apkarian, A. V., & Martina, M. (2009). Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 106(7), 2423-2428.

Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57, 1-164.

Moore, R. A., Evans, P. J., Smith, R. F., & Loyd, J. W. (1983). Increased cortisol excretion in chronic pain. *Anaesthesia*, 38(8), 788-791.

Murnion, B. P. (2018). Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. *Australian Prescriber*, 41(3), 60-63.

Nagano, M., Oishi, T., & Suzuki, H. (2011). Distribution and pharmacological characterization of primate nk-2 tachykinin receptor in the central nervous system of the rhesus monkey. *Neuroscience Letters*, 503 (1): 23-26.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2018). Peripheral Neuropathy Fact Sheet. Repéré à <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/Peripheral-Neuropathy-Fact-Sheet>

Neeck, G., Federlin, K., Graef, V., Rusch, D., & Schmidt, K. L. (1990). Adrenal secretion of cortisol in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 17(1), 24-29.

Newbern, D., & Freemark, M. (2011). Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 18(6), 409-416.

Nguyen, A., Armstrong, E. A., & Yager, J. Y. (2007). Neurodevelopmental Reflex Testing in Neonatal Rat Pups. *Journal of Visual Experiments*, <https://www.jove.com/video/55261>.

Nordeng, H., Ystrom, E., & Einarson, A. (2010) Perception of risk regarding the use of medications and other exposures during pregnancy. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 66(2), 207-214.

Nyberg, F., & Hallberg, M. (2007). Neuropeptides in hyperthermia. *Progress in Brain Research*, 162, 277–293.

Ochoa, J., & Torebjork, E. (1989). Sensations evoked by intraneural microstimulation of C nociceptor fibres in human skin nerves. *The Journal of Physiology*, 415, 583-599.

Oettl, L. L., Ravi, N., Schneider, M., Scheller, M. F., Schneider, P., Mitre, M., ... Kelsch, W. (2016) Oxytocin Enhances Social Recognition by Modulating Cortical Control of Early Olfactory Processing. *Neuron*, 90(3), 609-621.

Osterweis, M., Kleinman, A., & Mechanic, D. (1987). *Pain and Disability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives*. Washington: National Academies Press (US).

Overstreet, D. H. (2012). Modeling depression in animal models. *Methods in Molecular Biology*, 829,125-44.

Pailleux, F., Vachon, P., Lemoine, J., & Beaudry, F. (2013) Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides*, 47(4), 261-271.

Pantaleo, N., Chadwick, W., Park, S., Wang, L., Zhou, Y., Bronwen Martin B., & Maudsley, S. (2010). The mammalian tachykinin ligand-receptor system: an emerging target for central neurological disorders. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9 (5), 627–635.

Paradowska, E., Blach-Olszewska, Z., Sender, J., & Jarosz, W. (1996). Antiviral nonspecific immunity of human placenta at term: possible role of endogenous tumor necrosis factors and interferons. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 16(11), 941-948.

Parent-Vachon, M., Beaudry, F., Carrier, D., Di Cristo, G., & Vachon, P. (2019). The Effects of Exercise on Pain and Reproductive Performance in Female Pregnant Mice with Neuropathic Pain. *Biological Research for Nursing*. doi: 10.1177/1099800419857812

Parent-Vachon, M., & Vachon, P. (2018). Environmental enrichment alleviates chronic pain in rats following a spared nerve injury to induce neuropathic pain. A preliminary study. *Veterinary Medicine (Auckland)*, 9, 69-72.

Parkening, T. A., Collins, T. J., & Smith, E. R. (1982). Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiology in Aging*, 3(1), 31-35.

Patterson, T. A., Schmued, L. C., Sandberg, J. A., & Slikker, W. (2000). Temporal development of 2',3'-dideoxyinosine (ddI)-induced peripheral myelinopathy. *Neurotoxicology and Teratology*, 22(3), 429-434.

PrabhuDas, M., Bonney, E., Caron, K., Dey, S., Erlebacher, A., Fazleabas, ... Yoshinaga, K. (2015). Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nature Immunology*, 16(4), 328-334.

Przewłocki, R., Lasón, W., Konecka, A.M., Gramsch, C., Herz, A., & Reid, L.D. (1983). The opioid peptide dynorphin, circadian rhythms, and starvation. *Science*, 219(4580), 71–73.

Rapoport, A. M., & Edvinsson, L. (2019). Some aspects on the pathophysiology of migraine and a review of device therapies for migraine and cluster headache. *Neurological Science*, 40(Supplement 1), 75-80.

Rebordosa, C., Kogevinas, M., Bech, B. H., Sørensen, H. T., & Olsen, J. (2009). Use of acetaminophen during pregnancy and risk of adverse pregnancy outcomes. *International Journal of Epidemiology*, 38(3), 706-714.

Reinhardt, V., & Reinhardt, A. (2008). *Environmental Enrichment and Refinement for Nonhuman Primates Kept in Research Laboratories*. Washington, DC : Animal Welfare Institute.

Renn, C. L., & Dorsey, S. G. (2005). The Physiology and Processing of Pain: A Review. *AACN Clinical Issues*, 16(3), 277-290.

Reynolds, E. W., Riel-Romero, R. M., & Bada, H. S. (2007). Neonatal abstinence syndrome and cerebral infarction following maternal codeine use during pregnancy. *Clinical Pediatrics*, 46(7), 639-645.

Richner, M., Bjerrum, O. J., Nykjaer, A., & Vaegter, C. B. (2011). The Spared Nerve Injury (SNI) Model of Induced Mechanical Allodynia in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 54, e3092.

Ro, L. S., & Jacobs, J. M. (1993). The role of the saphenous nerve in experimental sciatic nerve mononeuropathy produced by loose ligatures: a behavioural study. *Pain*, 52(3), 359-369.

Rupniak, N. M. (2002). New insights into the antidepressant actions of substance P (NK1 receptor) antagonists. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80(5), 489–494.

Russo, C.M., & Brose, W. G. (1998). Chronic pain. *Annual Review of Medicine*, 49, 123-133.

Saidi, M., & Beaudry, F. (2017). Targeted high-resolution quadrupole-orbitrap mass spectrometry analyses reveal a significant reduction of tachykinin and opioid neuropeptides level in PC1 and PC2 mutant mouse spinal cords. *Neuropeptides*, 65, 37-44.

Saji, F., Samejima, Y., Kamiura, S., & Koyama, M. (1999). Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. *Reviews of Reproduction*, 4(2), 81-89.

Sanchez-Roige, S., Lalanza, J. F., Alvarez-Lopez, M. J., Cosin-Tomas, M., Grinan-Ferré, C., Pallas, M., Kaliman, P., & Escorihuela, R. M. (2014). Long-term wheel running changes on sensorimotor activity and skeletal muscle in male and female mice of accelerated senescence. *Age (Dordr)*, 36. Doi: 10.1007/s11357-014-9697-1

Schmidt, A., Morales-Prieto, D. M., Pastushek, J., Fröhlich, K., & Markert, U. R. (2015). Only humans have human placentas: molecular differences between mice and humans. *Journal of Reproductive Immunology*, 108, 65-71.

Schwarz, M. J., & Ackenheil, M. (2002). The role of substance P in depression: therapeutic implications. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 4(1), 21–29.

Seki, H., Zosmer, A., Elder, M.G., & Sullivan, M.H. (1997). The regulation of progesterone and hCG production from placental cells by interleukin-1 $\beta$ . *Biochimica Biophysica Acta*, 1336(2), 342-348.

Shah, S., Banh, E. T., Koury, K., Bhatia, G., Nandi, R., & Gulur, P., (2015). Pain Management in Pregnancy: Multimodal Approaches. *Pain Research and Treatment*, 2015. doi: 10.1155/2015/987483

Shenkin, H. A. (1964). The effect of pain on diurnal pattern of plasma corticoid levels. *Neurology*, 14, 1112-1117.

Shields, S. D., Eckert, W. A., & Basbaum, A. I. (2003). Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *Journal of Pain*, 4(8), 465-470.

Shirayama, Y., Ishida, H., Iwata, M., Hazama, G.I., Kawahara, R., & Duman, R.S. (2004). Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects. *Journal of Neurochemistry*, 90(5), 1258–68.

Simister, N. E. (2003). Placental transport of Immunoglobulin G. *Vaccine*, 21(24), 3365-3369.



- Sorge, L. E., & Strath, L. J. (2018) Sex differences in pain responses. *Current Opinion in Physiology*, 6, 75-81.
- Steeds, C. E. (2016). The anatomy and physiology of pain. *Surgery (Oxford)*, 34(2), 55-59.
- Stein, C., Millan, M.J., & Herz, A. (1988). Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 31(2), 445–51.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367–370.
- Stevens, B., McGrath, P., Gibbins, S., Beyene, J., Breau, L., Camfield, C., ... Yamada, J., (2007). Determining behavioural and physiological responses to pain in infants at risk for neurological impairment. *Pain*, 127, 94-102.
- Strittmatter, M., Bianchi, O., Ostertag, D., Grauer, M., Paulus, C., Fischer, C., & Meyer, S. (2005). Altered function of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in patients with acute, chronic and episodic pain. *Schmerz*, 19(2), 109-116.
- Tai, L. W., Yeung, S. C., & Cheung, C. W. (2018). Enriched Environment and Effects on Neuropathic Pain: Experimental Findings and Mechanisms. *PAIN Practice*, 18(8), 1068-1082.
- Tajerian, M., Alvarado, S., Millicamps, M., Vachon, P., Crosby, C., Bushnell, M. C., ... Stone, L. S. (2013). Peripheral nerve injury is associated with chronic, reversible changes in global DNA methylation in mouse prefrontal cortex. *PLoS One*, 8, e55259.
- Tennant, F. (2013). The Physiologic Effects of Pain on the Endocrine System. *Pain and Therapy*, 2(2), 75-86.
- Tepper, S.J. (2018). History and review of anti-calcitonin gene-related peptide (CGRP) therapies from translational research to treatment. *Headache*, 58(Supplement 3), 238-275.
- Tiller-Borcich, J. K., Capili, H., & Gordan, G. S. (1988). Human brain calcitonin gene-related peptide (CGRP) is concentrated in the locus caeruleus. *Neuropeptides*, 11(2), 55-61.
- Thakker-Varia, S., & Alder, J. (2009). Neuropeptides in depression: role of VGF. *Behavioural Brain Research*, 197(2), 262–278.
- Tighe, P., Buckenmaier III, C. C., Boezaart, A. P., Carr, D. B., Clark, L. L., Herring, A. A., ... Reisfield, G. M. (2015). Acute Pain Medicine in the United States: A Status Report. *Pain Medicine*, 16(9), 1806-1826.

Ullian, E. M., Harris, B. T., Wu, A., Chan, J. R., & Barres, B. A. (2004). Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture. *Molecular and cellular neurosciences*, 25(2), 241-251.

United States Department of Agriculture. (1991). Code of Federal Regulations. Part 3: Animal Welfare; Standards: Final rule. Federal registration 56 (No. 32): 6426-6505.

Vachon, P., Millecamps, M., Low, L., Thompson, S.J., Pailleux, F., Beaudry, F., Bushnell, C.M., & Stone, L.S. (2013). Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain. *Behavioral and brain functions*, 9, 22.

Vaishnav, K., & Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455(7215), 894-902.

Van der Lee, S., & Boot, L. M. (1955). Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta Physiologica et Pharmacologica Neerlandica*, 4(3), 442-444.

Vargas-Martinez, F., Uvnäs-Moberg, K., Petersson, M., Olausson, H. A., & Jimenez-Estrada, I. (2014). Neuropeptides as neuroprotective agents: oxytocin a forefront developmental player in the mammalian brain. *Progress in Neurobiology*, 123, 37-78.

Vincent, K., & Tracey, I. (2008). Hormones and their interaction with the pain experience. *Reviews in pain*, 2(2), 20-24.

Wall, P. D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J. W., Schonfeld, D., Seltzer, Z., & Tomkiewicz, M. M. (1979). Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*, 7(2), 103-111.

Walmer, D. K., Wrona, M. A., Hughes, C. L., & Nelson, K. G. (1992). Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*, 131(3), 1458-1466.

Warfvinge, K., & Edvinsson, L. (2019). Distribution of CGRP and CGRP receptor components in the rat brain. *Cephalalgia*, 39(3), 342-353.

Werler, M. M., Mitchell, A. A., Moore, C. A., & Honein, M. A. (2009). Is there epidemiologic evidence to support vascular disruption as a pathogenesis of gastroschisis? *American Journal of Medical Genetics: Part A*, 149A (7), 1399-1406.

Whitten, C. E., Donovan, M., & Cristobal, K. (2005). Treating chronic pain: new knowledge, more choices. *The Permanente Journal*, 9(4), 9-18.

Whitten, W. K. (1966). Pheromones and mammalian reproduction. *Advances in reproduction physiology*, 1, 155-177.

Wiberg, M., Westman, J., & Blomqvist, A. (1987). Somatosensory projection to the mesencephalon: an anatomical study in the monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 264(1), 92-117.

Wilkes, M. M., Watkins, W. B., Stewart, R. D., & Yen, S. S. (1980). Localization and quantitation of beta-endorphin in human brain and pituitary. *Neuroendocrinology*, 30(2), 113-121.

Willis, W. D. (1985). *The Pain System: The Neural Basis of Nociceptive Transmission in the Mammalian Nervous System*. Galveston: Karger.

Willis, W. D., Kenshalo, D. R., & Leonard, R. B. (1979). The cells of origin of the primate spinothalamic tract. *The Journal of Comparative Neurology*, 188(4), 543-573.

Yagel, S., Lala, P.K, Powell, W.A., & Casper, R.F. (1989). Interleukin-1 stimulates human chorionic gonadotropin secretion by first trimester human trophoblast. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 68(5), 992-995.

Ye, H., Du, X., & Hua, Q. (2018). Effects of voluntary exercise on antiretroviral therapy-induced neuropathic pain in mice. *The Journal of Physiological Sciences*, 68(4), 521-530.

Yoon, B. H., Jun, J. K., Romero, R., Park, K. H., Gomez, R., Choi, J. H., & Kim, I. O. (1997). Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 177(1), 19-26.

Yoon, B. H., Romero, R., Park, J. S., Kim, C. J., Kim, S. H., Choi, J. H., & Han, T. R. (2000). Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 182(3), 675-681.

Zdravkovic, M., Knudsen, H. J., Liu, X., Zachar, V., Aboagye-Mathiesen, G., & Ebbsen, P. (1997). High interferon alpha levels in placenta, maternal, and cord blood suggest a protective effect against intrauterine herpes simplex virus infection. *Journal of Medical Virology*, 51(3), 210-213.

Zhou, F., Chen, C., Huang, Y., Hu, H., Li, L., & Tan, Y. The effects of enriched environmental intervention on the parturition outcome and filial health of pregnant mice with chronic pain. *Biological Research for Nursing*, 20(3), 264-271.